Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie
der Freien Universität Berlin

CHRONISCHE UND AKUTE TRYPANOSOMA CONGOLENSE INFEKTION BEI MÄUSEN

Bestimmung serologischer, hämatologischer und histologischer Veränderungen im Infektionsverlauf und nach Berenil-Therapie

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Mieko Takeya
aus Tokio/Japan

1985

Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie
der Freien Universität Berlin

CHRONISCHE UND AKUTE TRYPANOSOMA CONGOLENSE INFEKTION BEI MÄUSEN

Bestimmung serologischer, hämatologischer und histologischer Veränderungen im Infektionsverlauf und nach Berenil-Therapie

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Mieko Takeya
aus Tokio/Japan

1.Referent: Prof. H.-J. Risse

2.Referent. Prof. H.Fenner

3.Referent: Prof. P.Nickel

Tag der letzen mündlichen Prüfung: 22.5.1985

Meinem Mann,

in Liebe und Dankbarkeit

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549619_0058

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Chronische Infektion	2
1.1.1. Infektionsverlauf	2
1.1.2. Pathologische, anatomische Befunde	3
1.1.3. Allgemeine klinische Symptome	4
1.1.4. Hämatologische Untersuchungen	4
1.1.5. Biochemische Veränderungen im Serum bzw. Plasma	8
1.1.6. Bekämpfung der Trypanosomiasis	12
1.2. Akute Infektion	19
1.3. Ziel der Arbeit	21
2. Material und Methoden	22
2.1. Versuchstiere, Infektionsmaterial	22
2.2. Durchführung des Infektionsversuches	22
2.3. Enzymaktivitätsbestimmung	23
2.4. Bestimmung von Stoffwechselprodukten im Plasma bzw. Serum	24
2.5. Hämatologische Untersuchungen	24
2.6. Histologische Verarbeitung	25
2.7. Elektrophorese der Plasma- bzw. Serumproteine	26
2.8. Nachweise der LDH- und GOT-Isoenzyme	26
2.9. Raketen-Immun-Elektrophorese	29
2.10. Berenil-Behandlung	30
2.11. Statistische Analyse	30
3. Ergebnisse	31
3.1. Chronische T.congolense Infektion	31
3.1.1. Untersuchungen während der chronischen Infektion an Mäusen	
a) Parasitämieverlauf	31
b) Hämatologische Untersuchungen	34
c) Plasmaprotein	38
d) Bestimmung von Harnstoff, Glukose und Gesamtbilirubin	44

e) Enzymaktivität 44
f) Körper- und Gewebsgewichte 52
g) Lysosomale Enzyme an Gewebeschnitten 54

3.1.2. Einfluß von Berenil auf die Infektion 59

a) Berenil-Behandlung nach langer Infektionsdauer 59
Parasitämieverlauf 59
Hämatologische Untersuchungen 59
Stoffwechselproduktbestimmungen 59
Plasmaprotein 61
Enzymaktivitäten 64
Körper- und Gewebsgewichte 67
Lysosomale Enzyme an Gewebeschnitten 67

b) Berenil-Behandlung nach kurzer Infektionsdauer 74

3.2. Akute T.congolense Infektion an Mäusen 74

a) Parasitämie- und Enzymaktivitätsverlauf während der akuten Infektion 74
b) Hämatologische, biochemische und Gewebsgewichts-Veränderungen am 3.Tag der akuten Infektion 78
c) LDH-Isoenzyme 79

4. Diskussion 81

4.1. Chronische Infektion 81

4.2. Akute Infektion 92

5. Zusammenfassung 95

6. Literaturverzeichnis 96

Abkürzungen

Acp	saure Phosphatase (EC 3.1.3.2)
Akt.	Enzymaktivität
Alp	alkaliche Phosphatase (EC 3.1.3.1)
BSA	Rinderserum Albumin
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (EC 2.6.1.1)
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (EC 2.6.1.2)
Hb.	Hämoglobin
KGW	Körpergewicht
LDH	Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.28)
NAD	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid
Naphtol AS-BI	6-Bromo-2-hydroxy-3-naphthoesäure 2-methoxyanilid
P.i.	post infectionem
PVP	Polyvinylpyrrolidone
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
Tryp.	Trypanosomen

1. Einleitung

Afrikanische Trypanosomen, zur Ordnung Kinetoplastida gehörende Flagellaten, sind extrazellulär lebende Blut- oder Gewebsparasiten von Wirbeltieren und werden in der Regel durch blutsaugende Insekten (Tsetse-Fliege) übertragen (Losos und Ikede, 1972; Soltys und Woo, 1977). Die Verbreitung der Trypanosomiasis, einer für Mensch und Nutztiere gleichermaßen schwerwiegenden Erkrankung, ist deshalb in ersten Linie an den Lebensraum der Tsetse-Fliege gekoppelt, einer Zone tropischen Klimas südlich der Sahara (Tsetse-Gürtel). Daneben können Trypanosomen auch passiv durch andere Insekten von Tier zu Tier übertragen werden. Dadurch erklärt sich das Vordringen einzelner Trypanosomarten auch in Regionen sub-tropischen Klimas (z.B. Mittelmeerraum).

Trypanosoma congolense, der Erreger der Nagana bei Weidetieren Afrikas, ist neben T.brucei und T.vivax der epidemiologisch wichtigste Vertreter der tierpathogenen afrikanischen Trypanosomen. Die Trypanosomiasis führt zur Beeintächtigung der Nutztierhaltung in Afrika und ist mit einer der Gründe für die schlechte Ernährungslage der einheimischen Bevölkerung. Aus diesem Grund haben Trypanosomen-Infektionen nicht nur eine medizinische sondern auch eine besondere wirtschaftliche Bedeutung (Ormerod, 1979)

Obwohl die Parasiten überwiegend im Blut vorkommen und daher ständig immunologischen Abwehrreaktionen ausgesetzt sind, verursachen sie in ihren natürlichen Wirtstieren längeranhaltende Infektionen. Hauptursache für das Überleben der Parasiten im Wirt ist die sogonannte Antigenvarianz. Darunter versteht man die Fähigkeit der Trypanosomen, ihre zelloberflächenständigen Antigene auszutauschen und damit das Immunsystem fortwährend mit neuen antigenen Determinanten zu konfrontieren (Terry et al., 1979). Dadurch wird zwar immer wieder eine Immunabwehr aktiviert, jedoch gelingt nie die vollständige Eliminierung der Parasiten. Deswegen endet die Infektion meist mit dem Tod des Wirts. Trotz dieser für viele Arten bekannten Überlebensstrategie der Trypanosomen werden im Einzelnen die unterschiedlichsten Infektionsverlaufsformen beobachtet. Je nach der Virulenz des jeweiligen

Trypanosomenstamms, der Empfänglichkeit der Wirtstiere, den Umwelts- und Ernährungsbedingungen und der Häufigkeit der Erreger-Kontakte ergibt sich ein akutes bzw. chronisches Krankheitsbild (Urquhart, 1980).

Die akute Infektion ist charakterisiert durch eine überschiessende Parasitämie (10^8-10^9 Tryp./ml Blut) und dem innerhalb weniger Tage erfolgenden Tod des infizierten Tieres.

Im Verlauf der chronischen Infektion beobachtet man anfänglich das Auftreten von einzelnen Parasitämieschüben (als Folge der Immunreaktion gegen aufeinander folgende Varianten), im fortgeschrittenen Stadium meist eine gleich bleibende Parasitämie auf niedrigem Niveau (10^5-10^6 Tryp./ml Blut).

Abgesehen von Großtieren lassen sich Trypanosomen durch Übertragen von infiziertem Blut auf Labornagern (Ratte, Maus) züchten.

1.1. Chronische Infektion

1.1.1. Infektionsverlauf

Wie beschrieben, verläuft die Infektion bei den mit T.congolense natürlich infizierten Weidetieren meist chronisch oder subakut. Bei experimentell mit T.congolense infizierten Rindern liegt die Präpatenzzeit gewöhnlich zwischen 3 und 10 Tagen (Tartour und Idris, 1973; Kobayashi et al., 1976b; Nielsen et al., 1978; Dargie et al., 1979a; Mills et al., 1980). Dagegen beobachtete Stephan (1966) nach dem Ansetzen eines Fliegenkäfigs mit einer einzigen infektionsfähigen Glossina, eine Präpatenz von 28 Tagen. Eine Tsetsefliege überträgt beim Saugakt maximal $5x10^4$ Trypanosomen (Krampitz, 1970).

Wegen der Immunabwehr gegen aufeinanderfolgende Varianten, verläuft die Parasitämie bei den chronisch infizierten Rindern und Schafen (Wellde et al., 1974; Kobayashi et al., 1976a; Mackenzie, 1978) wellenförmig. Maxie et al. (1979) berichteten im Gegensatz dazu, daß die Parasitämie der infizierten Rinder kein typisches Auf und Ab zeigte.

Valli et al. (1978a, 1980) und Mills et al. (1980) wiesen Unterschiede in Parasitämieverlauf zwischen älteren und neugeborenen

Kälbern nach. Der Parasitämiegipfel bei den älteren Kälbern trat erst am 11.Tag p.i. auf danach ein zweites Mal am 27. oder 34.Tag p.i., aber die neugeborenen Kälber zeigten einen Parasitämiegipfel nur am 17.Tag p.i., der zudem nicht so hoch wie bei den älteren Kälbern war. Vor allem waren die neugeborenen Kälber durch die T.congolense-Infektion wesentlich weniger geschädigt als die älteren. Selbst unter sonst identischen Bedingungen (Alter,Gewicht Infektionsdosis) ließen sich bei T.congolense-infizierten Kälbern ganz unterschiedliche Parasitämieverläufe nachweisen (Nielsen et al., 1978). Diese Ergebnisse zeigen, daß sowohl Alter als auch individuelle Unterschiede des Wirtes für die Art des Parasitämieverlaufs eine große Rolle spielen. Verallgemeinerungen der Infektionskinetik sind deshalb schlecht möglich.

1.1.2. Pathologische-anatomische Befunde

Verbreitung von T.congolense im Wirt

Im allgemeinen gilt T.congolense als Plasmaparasit und ist häufiger in den Kapillaren als in größen Gefäßen (z.B. der Jugularvene) vorhanden (Krampitz, 1970; Losos und Ikede, 1972; Losos et al., 1973; Mills et al., 1980). Büngener und Müller (1976) sowie Banks (1978) wiesen Adhärenz von T.congolense zum Kapillarendothel nach. Die Anhäufung der Trypanosomen in Kapillaren wird besonders in Gehirn, Herz und Skelettmuskel deutlich, nicht so ausgeprägt in Milz und Leber (Krampitz, 1970; Losos et al., 1973: Wellde et al., 1974).

Im Gegensatz zu diesen Autoren stellten Mills et al. (1980) mit Hilfe von Nadelbiopsien, nur wenige Trypanosomen im Skelettmuskel fest.

Andererseits beobachteten Luckins und Mehlitz (1978), daß T.congolense bereits 10 Tage p.i. in dem subkapsulären Sinus von Lymphknoten auftraten. Daraus schloß man, daß T.congolense kein ausschließlicher Plasmaparasit sein kann (Luckins und Gray, 1979).

Gewebsveränderungen

Die primären Mechanismen, die bei T.congolense-Infektionen zu pathologischen Veränderungen im Wirt führen, sind unbekannt.

Im Verlauf der Infektionen sind pathologisch-anatomisch auffallende Vergrößerungen von Milz, Leber, Niere, Herz und Lymph-

knoten, in deren Kapillaren sich meist viele Trypanosomen befinden, beschrieben(Fiennes, 1970; Losos et al., 1972; Sadun et al., 1973; Valli et al., 1978a; Maxie et al., 1979). Nach Losos und Mwambu (1979) war das Milzgewicht am 7.Tag p.i. nach der T.congolense-Infektion von Rindern schon um 50%, das Lebergewicht um 25% höher als das der Kontrollen. Die Nieren nahmen bis zum 7.Tag p.i. um 60% zu, waren aber am 69.Tag p.i. nur noch um 25% schwerer.

Valli und Forsberg (1979b) fanden bei den mit T.congolense infizierten Kälbern eine Vermehrung von Folliculi in der Milz, verbunden mit einer geringeren Zelldichte innerhalb der Folliculi. In der infizierten Leber beschrieben sie eine signifikante Zunahme der hepatozellulären Nucleoli Kupffer-Zellen-Anzahl und außerdem eine Erweiterung der Leber- und Mesenterialgefäße.

Im Gegensatz dazu stellten Wellde et al. (1974) keine Milzvergrößerung bei den mit T.congolense infizierten Rindern fest und nach Naylor (1971) sowie Losos et al. (1973) traten keine Lymphknotenvergrößerungen auf, zumindest bei künstlicher T.congolense-Infektion.

1.1.3. Allgemeine klinische Symptome

Als klinische Symptome im Verlauf der Trypanosomiasis kommt es zu einem intermittierenden Fieber, einer schwachen Anämie und allmählich zur Abmagerung der infizierten Tiere (Soltys und Woo, 1977; Maxie et al., 1979). Fieberschübe treten meist gleichzeitig mit Parasitämieschüben während der chronischen Infektion auf (Fienes, 1970; Wellde et al., 1974; Valli et al., 1978a). Maxie et al. (1979) fanden allerdings keine Korrelation zwischen Parasitämieanstieg und Fieberschub bei einer T.congolense-Infektion an Rindern. Naylor (1971), Griffin und Allonby (1979) beobachteten nur mäßige klinische Symptome bei chronischen T. congolense-Infektionen.

1.1.4. Hämatologische Untersuchungen

Anämie

Da die Anämie eine der wichtigsten primären chronischen Erscheinungen der Trypanosomiasis ist, wurden zahlreiche hämatologische Untersuchungen durchgeführt. Der Abfall von Erythrozytenzahl, Hämoglobinkonzentration, Hämatokritwert sowie gepacktem

Zellvolumen (PCV) treten sehr früh in der Infektion (4 Tage p.i. - 2 Wochen p.i.) auf, in mäßiger, zuweilen auch starker Ausprägung (Naylor, 1971; Losos und Ikede, 1972; Wellde et al., 1974; Holmes und Jennings, 1976; Ikede et al. 1977; Dargie et al., 1979 a; Mackenzie et al., 1978; Valli et al., 1978b). Naylor (1971), Holmes, Jennings (1976) und Valli et al. (1978b) stellten gleichzeitig den Anstieg des mitteleren zellulären Volumens der Erythrozyten (MCV) fest. Ein Abfall der osmotischen Resistenz der Erythrozyten war sowohl bei infizierten Rindern (Naylor, 1971) als auch bei infizierten Mäusen nachzuweisen (Ikede et al., 1977).

Drei verschiedene Mechanismen für die Ursache der Anämie bei Trypanosomiasis werden üblicherweise diskutiert: 1) Hämodilution, 2) Beschleunigter extra- und intravaskulärer Erythrozytenabbau, 3) Verminderte Erythropoese.

1) Hämodilution: Bei der T.congolense-Infektion wurde von vielen Autoren ein Anstieg des Plasmavolumens beobachtet (Naylor, 1971; Mamo und Holmes, 1975; Holmes und Jennings, 1976; Valli et al., 1978b; Dargie et al., 1979b; Valli und Forsberg, 1979b; Whitelaw et al., 1980). Sie nahmen an, daß die Verdünnung wahrscheinlich mit dem histologischen Befund einer mikrovaskulären Ausdehnung gekoppelt ist. Dabei stellten Holmes, Jennings (1976), Valli et al. (1978b) und Valli, Forsberg (1979b) auch eine mäßige Zunahme Erythrozytenvolumens fest. Dargie et al. (1979b) fand jedoch keine Erhöhung des Erythrozytenvolumens bei infizierten Kälbern.

Die durch die Zunahme des Plasmavolumens verursachte Blutverdünnung ist aber sicherlich nur teilweise für die Anämie verantwortlich. Dafür spricht, daß Holmes und Jennings (1976), Valli et al. (1978b) und Dargie et al. (1979b) gleichzeitig nachwiesen, daß die Lebensdauer der Erythrozyten bei den infizierten Rindern bzw. Kaninchen sich um ca. die Hälfte verkürzt, d.h. daß ein extravaskulärer Erythrozytenabbau oder (und) Hämolyse auch eine wichtige Rolle spielen.

2) Erythrozytenzerstörung: Folge einer extravaskulären Hämolyse ist eine massive Hämosiderinablagerung, wie sie im retikuloendothelialen System beschieben wurde (Mackenzie und Cruickshank, 1973; Ikede et al., 1977; Valli et al., 1978b; Dargie et al., 1979a,b). Valli et al. (1978b) nahmen an, daß die durch T.congo-

lense geschädigten Erythrozyten hauptsächlich durch Kupffer-Zellen der Leber zerstört werden. Ikede et al. (1977) dagegen hielten die Milz für das hauptverantwortliche Organ der Erythrozytenzerstörung.

Viele Untersuchungen wurden durchgeführt, um zu klären, auf welche Weise die Erythrozyten der infizierten Tiere zerstört werden. Zwei Hauptmechanismen werden diskutiert, einmal die Freisetzung einer aktiven hämolytischen Substanz aus Trypanosomen, zum anderen die Zerstörung durch einen immunologischen Angriff des Wirts.

Holmes und Jennings (1976) nahmen an, daß lebende T.congolense eine direkte hämolytische Wirkung haben, weil die durch die Infektion veränderten hämatologischen Parameter sofort nach der Eliminierung der Trypanosomen normalisiert waren. 1976 wiesen Tizard und Holmes eine hämolytisch wirkende Substanz aus T. congolense nach und zeigten später, daß es sich dabei um ein Gemisch von freien Fettsäuren (mit Linolsäure als eine der wirkungvollsten Komponenten), und möglicherweise auch um Lysolecithin handelt, das durch Reaktion von trypanosomaler Phospholipase A mit endogenem Phosphatidylcholin entsteht (Tizard et al., 1977). Sie fanden die hämolytische Aktivität in allen Zellfraktionen von T.congolense außer im Cytoplasma (Tizard et al., 1978 a,b,c,d), beobachteten jedoch auch, daß autolysierte T.congolense in vitro zwar eine erhöhte Fragilität von Rattenerythrozyten (nicht von Rindererythrozyten) verursachten, jedoch keine komplette Hämolyse.

Ikede et al. (1977) stellten demgegenüber fest, daß,obwohl eine erhöhte Fragilität der Erythrozyten bei der chronischen Infektion an Mäusen auftrat, kein Hämolysin im Plasma nachweisbar war. Nach Goodman (1958) sowie Tizard et al. (1978b) werden freie Fettsäuren im Blut sofort an Albumin gebunden. Darum muß die Parasitämie hoch sein, um die nötige Konzentration an freien Fettsäuren zu erreichen, die in vivo eine Hämolyse auslösen. Tizard et al. (1978b) stellten hierzu allerdings fest, daß Hämolyse in vitro mit 0.02-0.03mg/ml freier Fettsäuren erreicht wird.

Eine andere Erklärung der Hämolyse liefern immunologische Mechanismen. Mackenzie et al. (1978) stellten fest, daß Phagozytose

von Erythrozyten bzw. Leukozyten in T.congolense infizierten Schafen ausgelöst wird durch die Adsorption von Trypanosomenantigen an die Zelloberfläche. Auch Kobayashi et al. (1976b) wiesen nach, daß Trypanosomenantigene leicht an Erythrozyten adsorbiert werden können und ausschließlich Immunglobulin auf der Erythrozytenoberfläche der infizierten Rinder angelagert wird. Außerdem wurde ein Abfall der hämolytischen Komplementaktivität bzw. der C3-Komponenten im Serum im Verlauf der Infektion von Kobayashi und Tizard (1976a), Nielsen et al. (1978) und Tabel et al. (1980) beobachtet. Nach Tabel et al. (1980) war die Abnahme der Komplementaktivität zeitlich eng mit dem Auftreten des ersten Parasitämiegipfels verbunden.

Andererseits stellte Banks (1980) fest, daß Erythrozytenzerstörung nur auftritt, wenn an Erythrozyten mit Trypanosomen-Antigene, Antikörper und Komplement gebunden sind. Ikede et al. (1977) konnten kein Immunglobulin auf Erythrozyten der mit T.congolense infizierten Mäuse nachweisen.

Faßt man die bisherigen Beobachtungen über die Ursachen der Hämolyse zusammen, so muß man feststellen:

1: Der genaue Mechanismus ist noch nicht klar.

2: Erythrozyten aus verschiedene Tierspezies können präformierte Immunkomplex anlagern oder Trypanosomen-Antigen, die dann mit den entsprechenden Antikörpern reagieren. Solche Erythrozyten sind durch Komplement-vermittelte Lyse zerstörbar, bzw. werden phagozytiert.

3: Wie weit lytische Systeme über Lysophosphatide in vivo eine Rolle spielen, läßt sich bis jetzt nicht genau abschätzen.

3) Erythropoese: Hämosiderose und Zunahme der Eisenkonzentration im Serum (Tartour und Idris, 1973; Valli et al., 1978b; Dargie et al.,1979a) können einen Hinweis auf einen defekten Eisenaustausch zwischen Plasma und Knochenmark sein. Im chronischen Stadium können solche Erscheinungen durch verminderte Erythropoese verursachtet werden und Naylor (1971) beobachtete in der Tat Degenerationen im Knochenmark bei der T.congolense-Infektion an Rindern.

Messungen mit radioaktiven Eisen ergeben jedoch eine gesteigerte

Erythropoese (Mamo und Holmes, 1975; Dargie et al., 1979a). Dies bestätigte sich in Untersuchungen von Maxie et al. (1979), die eine Abnahme des Myeloid : Erythroid-Verhältnisses beobachteten. Trotz erhöhter Erythropoese ist der Verlust der Erythrozyten jedoch nicht zu verhindern - das spricht eher für eine größere Bedeutung hämolytischer Prozesse.

Weißes Blutbild und Differentialblutbild

Bei der Untersuchungen des weißen Blutbildes bzw. Differentialblutbildes wurde Lympho- und Neutropenie in der frühen Phase der Infektion beobachtet (Naylor, 1971; Losos et al., 1973; Forsberg et al., 1979; Maxie et al., 1979; Valli et al., 1979a; Valli und Mills, 1980). Wellde et al. (1974) fanden auch eine Leukopenie mit Beginn der Patenzzeiten, aber dabei einen prozentualen Anstieg der Lymphozyten. Valli et al. (1979a, 1980) stellten eine Lymphozytose nur im chronischen Stadium fest, während Losos et al. (1973) über einen Infektionszeitraum von 10 Wochen einen Leukozytenwert von 50% des Normalwertes beobachteten.

Maxie et al. (1979) nahmen als mögliche Ursachen eine Hemmung der Granulopoese im Knochenmark an (verursacht durch eine Verschiebung der Zellreifung zugunsten von Erythrozyten) oder einen verstärkten Abbau der Leukozyten. Kaaya et al. (1979) untersuchten in vitro den Einfluß des Serums von mit T.congolense infizierten Rindern auf die Bildung der Knochenmarksgranulozyten und Makrophagen. Daraus ergab sich, daß die Leukopenie hauptsächlich auf eine direkte Hemmung der Stammzellendifferenzierung, weniger auf einen Stammzellenmangel zurückzuführen ist.

1.1.5. Biochemische Veränderungen im Serum bzw. Plasma

Akute und chronische Erkrankungen führen häufig zu typischen Veränderungen im Serum der Patienten. Diese Veränderungen betreffen: a) Enzymaktivitäten, b) die niedermolekularen Bestandteile des Serums bzw. Plasmas, c) Serum- bzw. Plasmaprotein, d) Blutgerinnungsfaktoren,und stellen die Grundlagen serologischer Diagnostik dar.

Entsprechend dem sehr unklaren Bild der primären Läsionen bei Trypanosomenerkrankungen liegt auch für serologische Parameter

eine Reihe unterschiedlicher Befunde vor.

a) Enzymaktivitäten

Als diagnostische Methode haben Enzymaktivitätsbestimmungen im Serum bzw. Plasma eine große Bedeutung. Normalerweise finden sich zelluläre Enzyme im Blut nur in geringer Menge. Bei Permeabilitätsveränderungen von Zellen oder deren Zerstörungen treten die im Cytoplasma gelösten Enzyme vermehrt in das Blut über, bei nekrotisierenden Veränderungen sind oft auch mitochondriale Enzyme im Serum nachzuweisen. Man ist damit in der Lage, eine hochspezifische Diagnostik von Organ- und Zellerkrankungen im Blut zu betreiben und solchen Veränderungen im Verlauf der Erkrankungen zu folgen.

So dient Serum-Glutamat Oxalacetat Transaminase (GOT) als empfindlicher Indikator der Zellschädigungen der Leber bzw. der Herzmuskulatur. GOT liegt jeweils zu 50% im Cytoplasma und zu 50% in den Mitochondrien von Leber, Herz, Skelettmuskulatur vor, während z.B. eine andere Transaminase, Glutamat Pyruvat Transaminase (GPT) in der Leber nur im Cytoplasma vorkommt. Aus dieser Lokalisation der beiden Transaminasen ergeben sich diagnostische Hinweise für verschiedene Lebererkrankungen.

Zur Beurteilung von Muskelschäden erweist sich neben GOT besonders Serum-Lactat Dehydrogenase (LDH) als geeignet. Zwar kommt LDH (wie andere Enzyme) auch in anderen Organen vor, doch läßt sich die Organzuordnung durch Charakterisierung des Isoenzymmusters vornehmen. Bei Herzerkrankungen steigen LDH_1- sowie GOT-Aktivitäten im Serum an. Skelettmuskulaturschädigung verursacht eine Erhöhung der LDH_5-Aktivität.

Im Gegensatz zu den zahlreichen Untersuchungen zur Anämie existieren nur wenige Arbeiten über Serum-Enzymveränderungen bei T.congolense-Infektionen.

Wellde et al. (1974) bestimmten einige Enzymaktivitäten während der Infektion an Rindern und stellten fest, daß GOT erst innerhalb von 7-8 Wochen mäßig abnahm und danach relativ stabil blieb.

b) Die niedermolekularen Bestandteile des Serums bzw. Plasmas

Die Bestimmung der niedermolekularen Bestandteile des Plasmas

geben ebenfalls wichtige diagnostische Hinweise. Wellde et al. (1974) stellten neben der Enzymveränderungen fest, daß nur infizierte Rinder, die in einem frühen Infektionsstadium starben, einen Anstieg von Bilirubin während der ersten 12-13 Wochen und von Harnstoff während der ersten 7-8 Wochen zeigten. Dabei trat keine Veränderung der Glukose-Konzentration auf.

Nach Valli und Mills (1980) waren Gesamtlipide und Cholesterin bei den mit T.congolense infizierten Kälbern vermindert. Durch Elektrophorese stellten sie dabei den Abfall des α-Peaks der Lipide fest.

c) Serum- bzw. Plasmaprotein

Auch Veränderungen des Serum- bzw. Plasmaproteins sind klinische Symptome der T.congolense-Infektion. Von den meisten Autoren wird ein Abfall des Gesamteiweißwertes beschrieben, dessen Beginn jedoch ziemlich unterschiedlich zu sein scheint (Luckins, 1975; Tabel et al., 1980; Valli et al., 1980). Wellde et al. (1974) beobachteten, daß nach zunächst erfolgender Abnahme des Gesamteiweißwertes sich dieser allmählich wieder normalisiert. Die gleichzeitig auftretende Abnahme des Körpergewichtes wird deshalb in erster Linie auf einen Abbau der Gewebsproteine zurückgeführt, die zum Ersatz der Plasmaproteine beitragen.

Tabel et al. (1980) nahmen an, daß die abfallende Gesamtserumprotein-Konzentration auf die Plasmaverdünnung zurückzuführen ist und zur Ödembildung bei Rindern (Maxie et al., 1979) führt.

Mit der Abnahme der Gesamteiweißkonzentration wurde bei den Rindern stets ein Abfall der Albuminkonzentration beobachtet. Bei neugeborenen Kälbern jedoch war trotz der Abnahme des Albumins ein unverändert bleibendes Gesamteiweiß festzustellen, weil es gleichzeitig zu einer Zunahme der α- und γ-Globulinkonzentrationen gekommen war. Dieser Befund ließ sich jedoch merkwürdigerweise an 6 Monate alten Kälbern nicht mehr bestätigen (Valli et al., 1980).

Auch Veränderungen der β-Globulinfraktion während einer T.congolense-Infektion werden vereinzelt beschrieben. Wellde et al. (1974) und Valli et al. (1980) fanden in infizierten Rindern und 6 Monate alten Kälbern einen Abfall des β-Globulins, Luckins (1975) beschrieb genau das Gegenteil.

Im Gegensatz zu diesen widersprüchlichen Angaben wird übereinstimmend ein Anstieg der γ-Globuline beschrieben, (Wellde et al., 1974; Luckins, 1975; Valli et al., 1980) als Ausdruck der immunologischen Reaktion des Wirtes gegen die sich im Verlauf der Infektion ständig verändernden Parasitenpopulationen. Dies wurde dadurch gestützt, daß als Folge sich wiederholender Primärantworten speziell der IgM-Spiegel stark ansteigt (Luckins, 1975; Kobayashi und Tizard, 1976a; Luckins und Mehlitz, 1976; Nielsen et al., 1978; Whitelaw et al., 1980). Kobayashi, Tizard (1976a) und Luckins, Mehlitz (1976) stellten fest, daß in der späteren Phase die IgM-Konzentration eine mäßig abnehmende Tendenz zeigt.

Im Gegensatz zu anderen Autoren beobachteten Luckins und Mehlitz (1976) eine Zunahme des IgM nur bei der Hälfte der infizierten Rinder, und nach Tabel et al. (1981) trat kein signifikanter IgM-Anstieg im gesamten Infektionszeitraum auf. Auch Mansfield et al. (1976) fanden keine Erhöhung des IgM bei Mäusen, Meerschweinchen sowie Ratten und konnten mit T.congolense-Homogenat in diesen Tieren keine mitogene Reaktion auslösen.

Die Berichte über IgG, das als Sekundärantwort im Serum auftritt, sind besonders widersprüchlich. IgG_1 blieb nach Luckins (1975), Nielsen et al. (1978) unverändert. Kobayashi und Tizard (1976a) fanden eine Zunahme von IgG_1 ab der 7.Woche nach der Infektion, während Tabel et al. (1981) einen ausgeprägten IgG_1-Abfall feststellten. Luckins (1972), sowie Nielsen et al. (1978) fanden keine Veränderung von IgG_2 der infizierten Tiere, aber Kobayashi und Tizard (1976a) und Tabel et al. (1981) beschrieben, daß das IgG_2 ab der 7. Woche nach der Infektion um das ca. 1.5-fache zunimmt. Bei mit T.congolense infizierten Mäusen wiesen Morrison et al. (1982) nach, daß IgM, IgG_1, IgG_{2a} und IgG_{2b} nach dem ersten Parasitämiegipfel und dann noch einmal im späteren Stadium alle außer IgM anstiegen.

Außer IgM, IgG wiesen Nielsen et al. (1978) einen Abfall von IgA und IgE nach und beobachteten eine Korrelation zwischen der Parasitenanzahl oder dem Erkrankungszustand und den Serumimmunglobulinwerten, wenn die infizierten Rinder einzelne beobachtet wurden.

Die große Heterogenität der Befunde über die Veränderungen der Immunglobulinkonzentrationen hängt vermutlich mit dem Ausmaß der generellen Immunsuppression zusammen, die bei chronischen Infektion auftritt, und deren Eintreten sich in verschidenen Tierspezies zu unterschiedlichen Zeiten der Infektion auswirkt (Holmes et al., 1974; Mansfield, 1978).

d) Blutgerinnungsfaktoren

Im Verlauf der T.congolense-Infektion wurden Thrombozytopenie und Veränderungen von Fibrinogen ermittelt (Wellde et al., 1978; Forsberg et al., 1979; Maxie et al., 1979; Valli et al., 1980). Forsberg et al. (1979) fanden eine mäßige Hemmung der Thrombopoese und einen zunehmenden Abbau des Fibrinogens im späteren Stadium. Maxie et al. (1979) vermuteten, daß zusätzlich immunologische Thrombozytenschädigungen zur Thrombozytopenie beitragen.

1.1.6. Bekämpfung der Trypanosomiasis

Wie Ormerod (1979) in seinem Übersichtartikel beschrieb, spielt die Bekämpfung der Trypanosomiasis sowohl medizinisch als auch wirtschaftlich eine große Rolle. Auf drei Ebenen wird eine Kontrolle der Trypanosomiasis zu erreichen versucht.
a) Ausrottung der Tsetse-Fliege als Überträger, b) Immunologische Bekämpfungsmethode und c) Chemoprophylaktische bzw. chemotherapeutische Behandlungen.

a) Ausrottung der Tsetse-Fliege

Das Ausstreuen von Insektiziden, mit dem Ziel der Ausrottung der Tsetse-Fliege, ein früher häufig verwendetes und auch zum Teil erfolgreiches Verfahren, hat aber den Nachteil, daß es einen unzumutbar negativen Effekt auf die Umwelt ausübt und außerdem immense Kosten verursacht. Die als Alternative anzusehende Aussetzung steriler Glossina Männchen (sterile male technique), die von Dame seit 1970 angewendet wird, ist auch nicht vollständig erfolgreich, weil nicht alle Trypanosomiasisformen (z.B. die durch T.vivax, T.brucei verursachten) durch die Ausrottung der Tsetse-Fliege zu unterdrücken sind, und weil immer nur relative beschränkte Gebiete erfaßt werden können, in die von außerhalb immer wieder neue Trypanosomen einwandern können.

b) Vakzinierung

Außer der Ausrottung der Tsetse-Fliege wurde eine Vakzinierung unter bestimmten Verhältnissen versucht. Bei importierten Rindern kann eine bis zu 8 Monate andauernde Teil-Immunität durch künstliche Infektion mit einem Trypanosoma-Stamm und 14 Tage später erfolgender Berenil-Behandlung in subtherapeutischen Dosen induziert werden. Der Aufbau eines (zumindes teilweise erfolgreichen) Immunschutzes wurde auch versucht durch Immunisierung mit bestrahlten attenuierten oder chemisch inaktivierten Trypanosoma-Stämmen (Murray und Urquhart, 1977). Alle Immunisierungsverfahren erwiesen sich letztlich als wenig erfolgreich, weil sich die Immunität nur auf die zur Immunisierung verwendeten Trypanosoma-Stämme erstreckte und eine Infektion mit anderen Trypanosoma-Varianten oder -Arten nicht verhinderte.

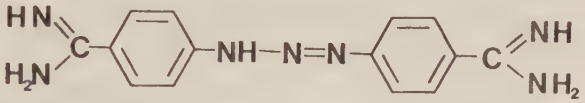
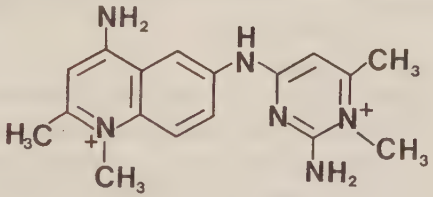
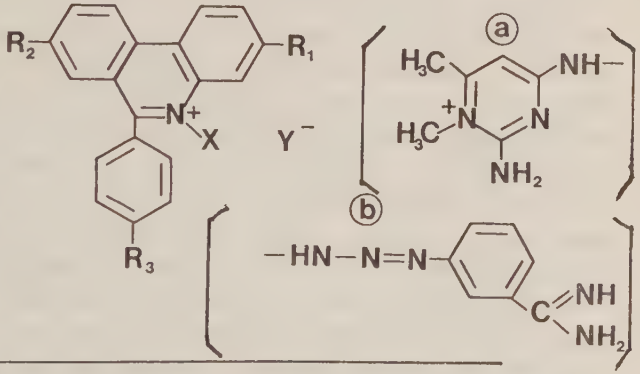
c) Chemoprophylaktische- und chemotherapeutische Behandlung

Auf Grund der erheblichen Schwierigkeiten, die mit der Ausrottung der Tsetse-Fliege bzw. der Immunprophylaxe verbunden sind, gelten Chemoprophylaxe und Chemotherapie zur Zeit als beste Bekämpfungsmethoden. Allerdings sind sie teuer und organisatorisch aufwendig. Verschiedene Präparate sind im Handel, die als Kurz-Zeit-Prophylaxe (Quinapyramin-Sulfat) oder als Lang-Zeit-Prophylaxe (Quinapyramin / Gemische Sulfat / schwerlösliches Chlorid) eingesetzt werden. Auch Pyrithidiumbromide (Prothidium) und Isometamidiumchlorid werden gelegentlich prophylaktisch angewandt. Ob derartige Präparate wirksam sind, hängt wesentlich von der Infektionshäufigkeit (Tsetsefliege-Dichte), von der jeweiligen Tierrasse und von der Bildung resistenter Trypanosomenstämme ab. Bei längerer Anwendung bilden sich regelmäßig Resistenz-Stämme aus. Dabei zeigten die Quinapyramin-resistenten Stämme auch eine Kreuzresistenz gegen Phenanthridine. Es ist noch nicht genau geklärt, wie diese Arzneimittelresistenz entsteht. Frimmer und Lämmer (1977) stellten folgende Annahme auf: Bei den resistenten Erregern könnten sich die sonst strukturell spezifischen Arzneimittel-Rezeptoren verändern. Damit wird eine Aufnahme des Mittels verhindert. Es wird auch angenommen, daß Resistenz durch ein verändertes Protein-Enzym-Muster des Erregers zustande kommt,

dessen Entstehung selektive Vorgänge zugrunde liegen. Von Brand (1979) teilte die Ansichten für den Mechanismus der Arzneimittelresistenz in zwei Gruppen, nämlich Veränderungen der Struktur von Enzymen oder des Stoffwechsels einerseits, und Veränderungen an der Durchlässigkeit von Membranen andererseits. Trotz der Arzneimittelresistenz der Trypanosomen gibt es auch Möglichkeiten, resistente Trypanosomenstämme bzw. rezidivierende Infektionen mit Chemotherapeutika aus anderen Verbindungsklassen erfolgreich anzugehen. Während Suramin vorwiegend in der Therapie menschlicher Schlafkrankheit eingesetzt wird, sind für die im Zusammenhang mit dieser Arbeit interessante Nagana vor allem Berenil und Ethidiumbromid von Interesse. Gerade bei resistenten Trypanosomenstämmen ist Berenil regelmäßig das Mittel der Wahl (Joyner, 1980).
Die hier beschriebenen Chemotherapeutika sind mit ihren Strukturformeln in Tab. 1 dargestellt.

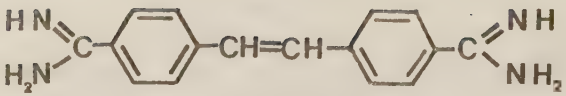
Berenil wurde wegen seiner besonderen Bedeutung als Modell-Therapeutikum in dieser Arbeit angewendet. Allerdings ist bekannt, daß chronische Trypanosomen-Infektion unter Berenil-Behandlung immer wieder zu Rezidiven führen. Es wäre denkbar, daß auch zur Ausbildung der Rezidive eine Berenil-Resistenz der Trypanosomen beitragen könnte. Jennings et al. (1977) zeigten jedoch, daß eine rezidivierende Infektion nicht von der Arzneimittelresistenz abhängt sondern davon, wann infizierte Tiere behandelt werden. Sie stellten fest, daß mit T.brucei infizierte Mäuse, die am 3. oder 7.Tag p.i. mit Berenil (40mg/kg) behandelt wurden, kein Rezidiv bekamen, aber alle infizierten Mäuse dann einen Rückfall bekamen, wenn die Berenil-Behandlung später als am 14.Tag p.i. durchgeführt wurde.

Berenil (4,4-Diamidin-diazoaminobenzol-diaceturat) wurde entwickelt, um "Gongasin", das das erste wirksame Arzneimittel gegen T.congolense war, zu verbessern und ist nicht nur gegen T.congolense bzw. T.vivax sondern auch gegen Babesien wirksam (Jensch, 1955; Bauer, 1955). Wegen der Diazoamino-Struktur zeigte Berenil bei der T.congolense-Infektion im Mäuseversuch von Hawking (Fußgänger und Bauer, 1958) stärkere Wirksamkeit als anderen Diamidine, vor allem Benzamidine (Stilbamidin, Pentamidin; ihre Formeln sind auf Seite 16 dargestellt).

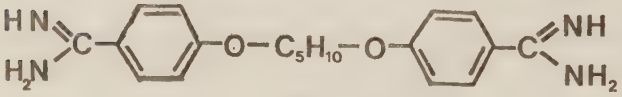
Name	Strukturformel
Berenil	
Quinapyramin	
Phenanthridine	

	R_1	R_2	R_3	X	Y
Ethidium	NH_2	NH_2	H	C_2H_5	Br-
Prothidium	NH_2	—[a]	NH_2	CH_3	Br-
Isometamidium	NH_2	—[b]	H	C_2H_5	Cl-

Tab.1: Strukturformeln von einigen zur T.congolense Therapie eingesetzten Pharmaka (nach William, 1970)



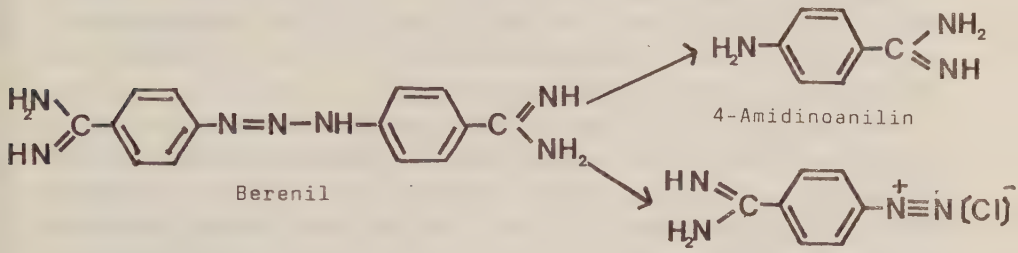
Stilbamidin



Pentamidin

Jensch (1955), Bauer (1956) und Fußgänger, Bauer (1958) nahmen an, daß die bessere Gewebsverträglichkeit, geringe Toxität und niedrige therapeutische Dosis von Berenil auf die leichte Wasserlöslichkeit bzw. schnelle Eliminierung zurückzuführen sind. Außerdem zeigte Fairclough (1963), daß auch die durch Berenil-Behandlung kaum auftretenden Arzneimittelresistenz der Trypanosomen mit der Geschwindigkeit seiner Ausscheidung und seines Abbaus zusammenhängt. Bereits 1956 stellte Bauer fest, daß die Serum-Berenil-Konzentration von mit 7,0mg/kg Berenil i.m. behandelten Hunden den maximalen Wert in 3 Stunden nach der Berenilgabe erreichte, und dann in 16 Stunden auf unter 1µg/ml abfiel. Daraufhin wurden genauere pharmakokinetische Untersuchungen einmal mit chemischen Analysen zum andern mit Hilfe der Radioisotopen-Methoden durchgeführt (Raether et al., 1972; Klatt und Hajdu, 1976; Goodwin und Tierney, 1977; Gilbert und Newton, 1982; Gilbert, 1983). Bei subcutaner bzw. intramuskulärer Applikation kam es zu einer schnellen Erhöhung des Serum-Spiegels (Serumspiegelmaxima nach 1,0-1,4 Std.) und anschließend zu einer zweiphasigen Elimination. Die Halbwertszeiten der schnellen Elimination (o,55-1,4 Std.) stimmten in allen Untersuchungen befriedigend überein. Für die langsamere Elimination wurden dagegen Werte von 7 bis 103 Stunden angegeben, die große Schwankungen zeigten. Solche Unterschiede sind wahrscheinlich auf die unterschiedliche Empfindlichkeit der Analysemethoden, die Applikationsdosen und die unterschiedlichen Versuchstierarten zurückzuführen. Im Vergleich mit der parenteralen Behandlung waren die Serumkonzentrationen bei der oralen Verabreichung von Berenil zwar niedrig, aber über einen längeren Zeitraum nachweisbar (Raether et al., 1972). Die geringe Resorption von Berenil über den Magen-Darm-Trakt beruht sehr wahrscheinlich auf dem sauren

Milieu des Magens. Die Diazoamino-Gruppe von Berenil wird in saurem Milieu leicht gespalten; dadurch kann wenig intaktes Berenil resorbiert werden.



Beide Spaltungsprodukte sind therapeutisch unwirksam (Jensch, 1955). Sie reagieren jedoch mit dem von Raether et al. (1972) verwendeten Nachweisverfahren, mit dem sie zu einem bestimmbaren Azostoff gekoppelt werden (Bratton und Marshall, 1939). Beide Spaltstücke werden so neben intaktem Berenil im Serum nachgewiesen und täuschen eine zu hohe Berenilkonzentration vor.

Bauer (1955) und Gilbert (1983) stellten fest, daß bei der parenteralen Verabreichung keinerlei Spaltungsprodukte von Berenil im Plasma auftreten. Genauere Hinweise auf den Stoffwechsel von Berenil bzw. seine Proteinbindung existieren nicht.

Dafür, daß die kurze Verweilzeit des Berenils vorwiegend auf Ausscheidung, nicht auf Abbau zurückzuführen ist, sprechen auch folgende Ergebnisse: Nach Jensch (1958) wurde 5-7µg Berenil/ml im Harn 5-24 Stunden nach der intramuskulären Gabe von 7mg/Kg beim Hund fast ohne Zersetzung nachgewiesen. Nach 48 Stunden enthielt der Harn nur noch Spuren von Berenil, dessen quantitative Bestimmung nicht möglich war. Andererseits wies Gilbert (1983) bei Kaninchen nach, daß bei 3,5mg/kg injiziertem Berenil, 40-50% der Injektionsdosis innerhalb 7 Tagen nach der Injektion in den Harn ausgeschieden wurden. Im Vergleich zur Ausscheidung in den Harn erreichte das Eliminierungsprozent im Stuhl bei behandelten Kaninchen innerhalb 7 Tagen nach der Injektion nur 8-20%.

Im gleichen Versuch von Gilbert (1983) wurde zurückbleibendes Berenil in verschiedenen Geweben auch am 7.Tag nach der Injektion gemessen. In der Leber war die höchste Berenil-Menge, 40µg/g

Gewebsgewicht (naß), entsprechend 30-50% der Injektionsdosis, nachgewiesen. Darauf folgten Nieren, in deren die Berenilkonzentration nur 3µg/g betrug. Daraus nahm Gilbert (1983) an, daß in de der Leber zurückbleibendes Berenil prophylaktisch wirken könnte, wie Wellde und Chumo (1983) beschrieben. Im allgemeinen wird Berenil selten als Prophylaktikum verwendet.

Bauer (1958) zeigte in der Untersuchung über den Wirkungsmechanismus des Berenils bei T.congolense, daß Berenil relativ schnell irreversibel an die Trypanosomen gebunden wird, d.h. eine direkte Wirkung auf Trypanosomen vorliegt, daß die durch Berenil geschädigten Trypanosomen phagozytiert werden und damit die chemotherapeutische Wirkung des Präparates unterstützt wird. Weiter wurde gezeigt, daß die Wirkung auf die Trypanosomen umso stärker war, je weniger Glukose im Blut zur Verfügung stand. Glukose ist für im Blut lebende Trypanosomen die Hauptenergiequelle. Da Berenil den Glukosestoffwechsel der Wirtstiere nicht beeinflußt, nahm Bauer an, daß Berenil den Glukosestoffwechsel der Trypanosomen selbst blockiert. Später stellte Newton (1970) fest, daß der Wirkungsmechanismus von Berenil, auch der der meisten anderen Trypanozide, abgesehen von Arsen-haltigen Präparaten und Suramin, auf der starken Hemmung der Nucleinsäure-oder Proteinsynthese beruht;Berenil lagert sich bevorzugt in Kinetoplast-DNA ein und hemmt dadurch die Replikation. Ultraviolett-Mikroskopie zeigte in T.brucei, die aus mit Berenil behandelten Ratten isoliert wurden, eine starke blaue Fluoreszenz im Kern und Kinetoplast (Newton und Le Page, 1967). Durch weitere Untersuchung wurde nachgewiesen, daß diese Fluoreszenz bei niedriger Berenil-Konzentration nur im Kinetoplast, aber bei höherer Konzentration zuerst im Kinetoplast und dann im Kern auftrat (Newton, 1972). In nicht Berenil-behandelten Tieren zeigten daraus isolierte Trypanosomen diese typische Veränderungen nicht.

Als akute Nebenwirkung von Berenil werden Tremor, Nystagmus und Ataxien, aber keine chronisch pathologischen Veränderungen in Leber, Milz, Nieren und Herzen oder andere krankhafte Symptome beschrieben (Bauer, 1955, 1956; Fußgänger, 1958; Schnitzer und Hawking, 1963). Nach Brander et al. (1982) haben Diamidine Nebenwirkungen wie Arterienerweiterung, abnehmenden Blutdruck, Zunahme der Darmmuskulatur-Mobilität und Schädigungen hauptsächlich an Nieren und Leber.

Einige Autoren untersuchten den Einfluß von Berenil auf die durch die T.congolense-Infektion geänderten Parameter. Holmes und Jennings (1976) behandelten T.congolense infizierte Kaninchen bzw. Rinder mit Berenil (25mg/kg i.m., bei Kaninchen; 5mg/kg, bei Rindern) zwischen 3 bis 5 Wochen nach der Infektion und stellten fest, daß alle veränderten Parameter (Parasitämie, hämatologische Faktoren, Plasmavolumen, Erythropoese, Eliminierung der Erythrozyen aus dem Kreislauf) schnell auf die Kontrollwerte zurückgingen. Die Untersuchung von Mackenzie et al. (1978) zeigte auch die Wiederherstellung der abfallenden Hämoglobinwerte bzw. Reticulozytenanzahl von infizierten Schafen nach der Berenilgabe (3.5mg/kg) am 28.Tag p.i.. Außerdem stellten sie dar, daß die in infizierten Ziegen auf der Erythrozytenoberfläche angelagerten Trypanosomen-Antigene wenige Tagen nach der Berenil-Behandlung nicht mehr nachweisbar waren. Nach Mackenzie et al. (1979) senkte Berenil den erhöhten IgM-Wert infizierter Ziegen nicht, wohl aber den IgG-Wert. Mills et al. (1980) untersuchten die Elimination der Trypanosomen aus der Jugularvene und aus den Kapillaren im Gehirn durch Berenil-Behandlung. Dabei war nachzuweisen, daß in den Kapillaren im Gehirn bereits 30 Minuten nach der Berenilgabe keine Trypanosomen mehr vorhanden waren, obwohl sie in der Jugularvene immer noch existierten. Dies ist insofern merkwürdig als das Auftreten von Rezidiven nach der Berenil-Behandlung des Wirtstieres durch Trypanosomen erfolgen soll, die aus Berenil unzugänglichen Gehirnregionen stammen (Jennings et al., 1979).

1.2. Akute Infektion

1.2.1. Infektionsverlauf

Wellde et al. (1974) nannten den T.congolense-Infektionsverlauf von 2 infizierten Rindern akut, die im Vergleich zu den anderen infizierten Rindern früher (in 52-98 Tagen nach der Infektion) starben und kurz vor dem Tod höhere Parasitämien zeigten. Die Parasitämie verlief aber bis zur Hälfte des Untersuchungszeitraums wellenförmig wie bei einer chronischen Infektion, stieg erst danach in einigen Parasitämieschüben an. Betrachtet man

diese Parasitämieverlaufsform, so ist es problematisch, sie als "akut" zu bezeichnen.

Außer dieser Untersuchung ist kein akuter Infektionsverlauf bei den T.congolense infizierten Großtieren beschrieben.

Anders bei Labornagern : Simaren, Bammek (1970) und Simaren, Awopetu (1973) fanden einen typischen akuten Infektionsverlauf bei T.congolense ($4x10^3$ oder $1x10^4$ Tryp.) infizierten Ratten, die alle innerhalb 9-15 Tagen nach der Infektion starben. Die Parasitämie stieg nach der Präpatenz mit 3-4 Tagen immer bis zum Wert über $3x10^8$ Tryp./ml Blut an. Außerdem beschrieben Simaren und Awopetu (1973), daß die Parasitämie bei schwangeren Ratten schneller anstieg, und den höchsten Wert über 10^9 Tryp./ml am 11.Tag p.i. (4 Tage früher als bei den nicht schwangeren Ratten) erreichte. Bei der Untersuchung von Whitelaw et al. (1980) verlief die Infektion bei CLFP-Mäusen ($1x10^4$ Tryp.) akut, führte in 8-10 Tage Tagen p.i. zum Tod. Ihre höchste Trypanosomenanzahl betrug am 7. Tag p.i. ca. $1x10^9$ Tryp./ml Blut.

1.2.2. Veränderungen bei der akuten Infektion

an Mäusen

Whitelaw et al. (1980) untersuchten die Veränderung folgender Parameter bei den mit T.congolense infizierten Mäusen. PCV fiel parallel mit dem Parasitämieanstieg erheblich ab. Die Zunahme des Blutvolumens und die Abnahme des Erythrozytenvolumens waren ebenfalls festzustellen. Enzymaktivitätsbestimmungen am 8.Tag p.i. und auch einige Messungen von niedermoleklaren Serumbestandteilen ergaben: Die LDH-, GOT- und GPT-Aktivitäten stiegen auffallend auf das 6-9 fache an. Die infizierten Mäuse, die 10 Tage lang überlebten, zeigten einen dramatischen Glukose-Abfall, Harnstoff-Anstieg aber erst kurz vor dem Tod. Bei alkalischer Phosphatase, Creatin-Phosphokinase, Kreatinin und Bilirubin waren keine Veränderungen nachzuweisen. Außerdem stellten sie eine abnehmende Tendenz des Albumin-spiegels und eine Zunahme an IgM fest. Anderseits blieben sowohl IgG_1 als auch IgG_2 unverändert.

an Ratten

Bei der akuten Infektion an Ratten waren (wie bei den infizierten Mäusen) ein Abfall der Erythrozytenanzahl und der Glukose festzustellen (Simaren und Bammeke, 1970; Simaren und Awopetu, 1973).

Außerdem fand man einen Anstieg der Leukozytenanzahl, einen Abfall des Albumins und eine abnehmende Tendenz von β-Globulin. Simaren und Awopetu (1973) wiesen Unterschiede der Harnstoff- und Cholesterin-Konzentration zwischen schwangeren und nicht schwangeren Ratten nach; ein Anstieg der Harnstoffkonzentration trat nur bei den infizierten schwangeren Tieren auf. Cholesterin stieg bei infizierten Ratten an, aber bei den nicht schwangeren Ratten viel stärker als bei den schwangeren. Daraus schlossen sie, daß die infizierten Ratten sowohl an Hypoglykämie als auch an Hypercholesterolämie leiden.

1.3. Ziel der Arbeit

Wie die Literaturübersicht zeigt, sind die Befunde über serologische Veränderungen bei T.congolense-Infektionen außerordentlich widersprüchlich. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb der Versuch unternommen werden, an standardisiertem Tiermaterial und mit einheitlichen Infektionsmaterial Modell-Infektionen zu setzen und unter reproduzierbaren Bedingungen die Serumveränderungen auszutesten. Dabei sollen einmal die Verhältnisse bei chronischer Infektion mit derjenigen einer akuten Erkrankung verglichen werden. Zum anderen soll untersucht werden, welchen Einfluß eine Chemotherapie mit dem häufigsten in der Praxis gebrauchten Trypanozid, Berenil, auf die veränderten Blutwerte hat, bzw. wie sich das Wiederaufflammen der Parasitämie nach Absetzen der Therapie auswirkt.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere, Infektionsmaterial

Als Versuchstiere für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit dienten weibliche Mäuse (NMRI, ca.20-25g) aus der Zucht des veterinärmedizinischen Versuchstierstalls der Freien Universität Berlin.

Bei dem für die akuten Infektionsuntersuchungen verwendeten Parasitenstamm handelt es um Trypanosoma congolense (T.C. 423), der von unbekannter Herkunft ist, über 7-8-Jahre von Maus zu Maus passagiert wurde und als Stabilat in flüssigem Stickstoff gehalten wurde.

Für die chronische Infektion wurde ein anderer T.congolense-Stamm aus dem Institut für Parasitologie der F.U. Berlin zur Verfügung gestellt. Der Stamm (T.C. 4905)wurde 1981 aus Rindern in Togo isoliert, und wurde zweimal über Mäuse passagiert.

2.2. Durchführung des Infektionsversuches

Chronische Infektion bei Mäusen

Für den chronischen Infektionsversuch wurden die Tiere folgenderweise infiziert: Zur Ausschaltung des Immunsystems wurden Mäuse zuerst mit 900 rad bestrahlt und mit je 0.3ml Stabilat des Stammes (T.C. 4905, $2x10^7$ Tryp./ml) angeimpft. In 3-4 Tagen war eine ausreichende Parasitämie im peripheren Blut erreicht. Das Blut der infizierten Mäuse wurde nach Dekapitation gewonnen und in eiskaltem PSG/Citrat-Puffer (44mM NaCl, 55mM Glukose, 3mM NaH_2PO_4, 10mM Na-Citrat, PH 8.0) aufgefangen. Nach entsprechender Verdünnung des Blutes wurden die Trypanosomen in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Danach wurden 110 Mäuse gleichzeitig mit je $1x10^6$ Trypanosomen intraperiteoneal infiziert. Als Kontrolltiere dienten 100 Stück aus dem gleichen Mäusestamm. Je vier bis fünf Mäuse von der infizierten und der Kontroll-Gruppe wurden nach zufälliger Auswahl alle 3 oder 4 Tage zur Untersuchung herausgenommen.

Nach der Messung des Körpergewichts wurde Blut (ca. 1ml mit einer heparinisierten Spritze) aus der Vena Cava Posterior unter Betäubung mit Nembutal (Pentobarbital Natrium, Abbott, in Dosis 30mg/

kg) entnommen. Danach wurden die Leber, die Milz sowie die Nieren herausgenommen und gewogen. Die Blutentnahme während des chronischen Infektionsverlaufs erfolgte stets zwischen 8 und 9 Uhr vormittags, um tageszeitliche Schwankungen der zu bestimmenden Parameter zu vermeiden. Um fütterungsbedingte Schwankungen auszuschließen wurden die Mäuse 12 Stunden vor dem Untersuchungsbeginn nüchtern gehalten.

Alle Messungen wurden einzeln durchgeführt und die Mittelwerte aus jeder Gruppe dargestellt.

Zwischen dem ersten Parasitämietal und dem ersten Parasitämiegipfel starben insgesamt 26 von 110 infizierten Mäusen hintereinander (am 9.Tag p.i., 5 Mäuse; am 10.Tag, 8; am 11.Tag, 10; am 12.Tag, 3). Danach starben 12 infizierte Mäuse in unregelmäßigen Abständen (am 16.Tag, 1 Maus; am 19.Tag, 1; am 27.Tag, 1; am 30.Tag, 1; am 34.Tag, 2; am 36.Tag, 1; am 38.Tag, 3; am 43.Tag, 1; am 44.Tag, 1).

Zum Parasitämienachweis wurden 5µl bzw. 10µl Blut mit PSG/Citrat Puffer 100 fach verdünnt, danach wurde die Trypanosomenanzahl in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Falls kein Trypanosom im verdünnten Blut gefunden wurde, wurde Blut ohne Verdünnung auf Trypanosomen kontrolliert.

Akute Infektion an Mäusen

Zur akuten Untersuchung wurden 35 Mäuse gleichzeitig mit je 0.1ml Stabilat von dem Trypanosomen congolense Stamm (T.C. 423, ca. $4x10^6$ Tryp.) i.p. infiziert. Aus 5 bis 8 infizierten Mäusen wurde jeweils Blut durch Dekapitation 24, 48, 72, 84 sowie 96 Stunden nach der Infektion abgenommen. Als Kontrolltiere wurden jedesmal 5 Mäuse verwendet. Die Mittelwerte jeder Gruppe werden dargestellt.

2.3. Enzymaktivitätsbestimmung

Zur Enzymaktivitätsbestimmung im Plasma bzw. Serum wurde Blut 10 Minuten bei 1500g bei 4°C zentrifugiert (Bei der chronischen Infektionsuntersuchung wurden Plasma und bei der akuten Infektionsuntersuchung Serum genommen, diés hatte keinen Einfluß auf die Ergebnisse). Die Enzyme Lactat-Dehydrogenase (LDH), Glutamat-

Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), alkaliche Phosphatase (Alp) und saure Phosphatase (Acp) wurden photometrisch nach den analytischen Methoden von Bergmeyer (1974) bestimmt. Alle Messungen erfolgten am Beckman Spektrophotometer Modell 25. Die Meßtemperatur betrug bei allen Enzymbestimmungen 25°C.

2.4. Bestimmung von Stoffwechselprodukten im Plasma bzw. im Serum

Für die Bestimmung von Harnstoff und Glukose wurde die Test-Combination der Fa. Boehringer Mannheim angewendet (Harnstoff: Farb-Test nach Ureasespaltung, Glukose: Glukoseoxidase-Methode). Beide Verfahren waren auf mikro- bzw. halbmikro-Maßstab adaptiert.

Die Gesamtbilirubinbestimmung wurde nach Jendrassik und Gróf (1938) durchgeführt.

Der Gesamteiweißgehalt des Plasmas bzw. Serums wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt.

2.5. Hämatologische Untersuchungen

Die hier beschriebenen Methoden wurden aus "Klinische Chemie und Mikroskopie" von Rick (1977) entnommen.

Zur Hämoglobinbestimmung wurde die Hämoglobincyanid-Methode verwendet. 10µl Blut wurden mit 2,5ml "Transformationslösung" (KH_2PO_4 1mM, KCN 1,75mM, $K_3Fe(CN)_6$ 0,6mM, SDS 5%) gemischt. Nach 30 Minuten Stehenlassen wurde die Lösung bei 546nm gemessen und die Konzentration (C) des Hämoglobins im Blut wurde berechnet nach $C = 3{,}677 \times E$ (g/l).

Die Bestimmung des Hämatokrits erfolgte nach dem Zentrifugieren des ca. 3/4 mit Blut gefüllten Mikrohämatokritröhrchens (BRAND). Nach dem Zentrifugieren wurde der Hämatokritwert abgelesen.

Zur Prüfung auf osmotische Resistenz der Erythrozyten wurden 5µl Blut in Kochsalzlösungen (je 2,5ml) abnehmender Konzentration (von 0,80 bis 0,45% mit je 0,05%igen Konzentrationsunterschied) und in Aqua bidest. (als 100% Hämolyse Standard) gebracht. Mehr als 6 Stunden nach der Mischung wurde der Überstand bei 412nm gemessen.

Die Thrombozytenzahl wurde (1:100 Blutverdünnung mit 1%iger Ammoniumoxalatlösung) in 5 Gruppenquadraten zu je 16 Kleinst-

quadraten der Neubauer-Zählkammer bestimmt (n). Die Berechnung der Thrombozytenzahl im µl Blut erfolgte nach der Formel:
Thrombozyten/µl Blut = n x 5000

Für die Erythrozytenzählung wurde Blut mit HAYEMscher Lösung (0,25g $HgCl_2$, 2,5g Na_2SO_4, 0,5g NaCl, Aqua bidest. ad. 100ml) 1 + 199 verdünnt. Mit den in 5 Gruppenquadraten zu je 16 Kleinstquadraten gezählten Erythrozyten (n) wurden die Erythrozyten pro µl Blut nach folgender Formel berechnet:
Erythrozyten/µl Blut = n x 10,000

Die Zahl der Leukozyten (in den 4 Eckquadraten der Zählkammer) wurde nach 20-facher Blutverdünnung mit 3%iger Essigsäure notiert (n), dann wurden die Leukozyten/µl Blut nach der Formel berechnet:
Leukozyten/µl Blut = n x 50

Die Färbung von Blutausstrichen für das Differentialblutbild wurde nach Pappenheim mit der MAY-GRÜNWALD-Lösung (eosinsaures Methylenblau in Methanol : Glycerin (2:1)) und der 20-fach mit Aqua bidest. verdünnten GIEMSA-Lösung (Azur II sowie eosinsaures Azur II in Methanol : Glycerin (1:1)) durchgeführt. Aus den Prozentzahlen und den Gesamtleukozytenzahlen wurde das absolute Differentialblutbild berechnet.

2.6. Histologische Verarbeitung

Fixierung der Gewebe

Zu jedem Versuchstermin (sieh Seite22) während des chronischen T.congolense-Infektionsverlaufs wurden Leber, Milz und Nieren aus infizierten Mäusen bzw. Kontrollen entnommen. Die in ca. 3mm Dicke geschnittenen Organteile wurden in 1% $CaCl_2$ enthaltender 4%iger Formaldehydlösung (min. 37% säurefrei, Merck Darmstadt) bei 4°C ca. einen Tag lang fixiert. Nach dem Abtropfen der Formaldehydlösung wurden die Gewebeschnitte in 30%iger Saccharoselösung mit 1%igem Gummi Arabicum bei 4°C 1-2 Tage aufbewahrt und danach bis zur Untersuchung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Histochemische Färbung

Mit Hilfe eines Kryostatmicrotoms (Kryostat system, Dittes Linde) wurden aus den eingefrorenen Geweben 10µm dicke Schnitte hergestellt. An diesen wurden histochemische Nachweise geführt auf

1) saure Phosphatase (nach Barke und Anderson, 1963)

2) β-Glucuronidase (nach Hayashi et al., 1964)

Gewebeschnitte wurden freischwimmend jeweils 15 Minuten bei 37°C in der sauren Phosphatase-Inkubationslösung (Naphtol AS-BI Phosphat 1,1mM, Dimethylformamid 5%, Hexazonium-Pararosanilin 5,0mM, Natrium-Acetat 36,5mM, Barbital Natrium 36,5mM, PH 5,0) bzw. in der β-Gluconidase-Inkubationslösung (Naphtol AS-BI-β-D-Glucuronsäure 0,1mM, Acetat Puffer 40mM, Hexazonium-Pararosanilin 1,9mM, PH 5,0) inkubiert. Nach Inkubationsende wurden die Schnitte 2 mal 2 Minuten in 0,9%iger NaCl-Lösung gespült und mit einem angelhakenförmigen Glasstab auf den Objektträger gelegt. Die Schnitte auf dem Objektträger wurden auf der Wärmeplatte kurz erwärmt, danach mit Glyceringelatine (Merck) bedeckt.
Diese Präparate wurden unter dem Mikroskop beobachtet. Alle hier verwendeten Chemikalien waren von SIGMA Chemie GmbH.

2.7. Elektrophorese der Plasma- bzw. Serumproteine

Für die Elektrophorese wurde 1,2% Seakem ME Agarose (FMC Corp. Marine Colloid P.V.) mit 50mM Barbital Puffer (PH 8,6) auf den Objektträger (26 x 100 mm) 1.4mm Dicke gegossen. Nach dem Auftragen der Probemischung (Plasma bzw. Serum und 1,2%ige Agarose Lösung) erfolgte die Elektrophorese 90 Minuten bei 200V mit 50mM Barbital Puffer in der von Siegert (1978) entwickelten Apparatur (Abb.1). Nach einstündiger Fixierung in 5%iger Essigsäure wurden die Träger zum Entzug der Puffersalze 3 Stunden in Aqua dest. gewässert. Nach der Trocknung bei 40°C wurden die Träger in 0,5%iger Amidoschwarzlösung (mit 5% Essigsäure) gefärbt. Die Auswertung der Pherogramme wurde mit einem von Siegert und Siemes (1977) modifizierten Analogrechner vorgenommen.

2.8. Nachweise der LDH- und GOT-Isoenzyme

Gewebe-Extrakt für LDH- und GOT-Isoenzyme (Graubaum, 1977)

Herz-bzw. Leber-Extrakt für beide Enzyme und Skelettmuskel-Extrakt für LDH wurden mit folgender Methode hergestellt:
0,5g Gewebe (Herz 0,25g) wurden in eiskalter physiologischer NaCl-Lösung klein geschnitten und gespült. Die klein geschnittenen Gewebe wurden mit 0,1M Phosphat Puffer (PH 7,4) im Potter Homogenisator zu 10%igen Homogenaten homogenisiert. Die Homoge-

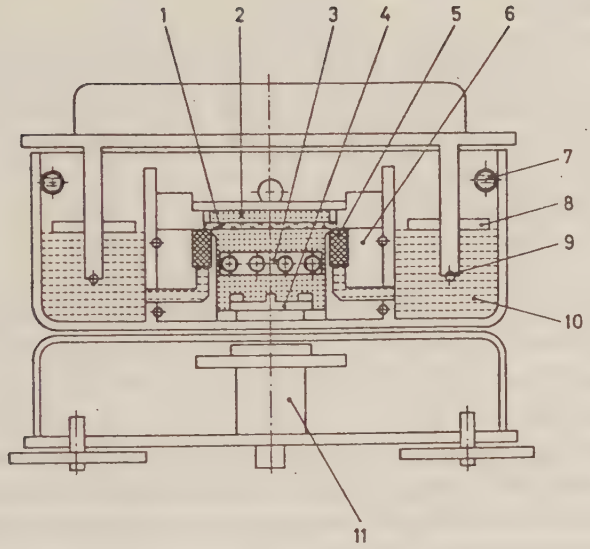


Abb.1: Elektrophorese Apparatur (nach Siegert, 1978)
1. Agarosegelträger, 2. Petroläther, 3. Kühlrechen, 4. Magnetrührer, 5. Kastenelektroden, 6. Elektrodenblöcke, 7. Zuführungen der Puffer, 8. Überlaufschlitz, 9. Platinum Elektrode, 10. Puffer, 11. Pumpe für Manetrührer

nate wurden sofort 30 Minuten bei 10.000xg zentrifugiert, der Überstand nach der entsprechenden Verdünnung für die Elektrophorese verwendet.

Für GOT-Isoenzyme wurden Mitochondrien-Fraktionen aus Herzextrakt nach Van der Laase (1980) hergestellt. Nach dem Abspülen der Herzen mit 0.9%iger NaCl-Lösung wurden die klein geschnittenen Herzen in 0,18mM KCl, 10mM EDTA, 0,5% BSA, PH 7,2 homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 Minuten bei 12.000xg, dann dessen Überstand weiter 20 Minuten bei 10.000xg zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 0,18mM KCl, 1mM EDTA, 5% BSA PH 7,2 resuspendiert und 20 Minuten bei 10.000xg rezentrifugiert. Dieser Niederschlag wurde im Suspensionpuffer (0,1mM α-Oxoglutarat, 0.1mM Mercaptoethanol, 0,02mM Pyridoxalphosphat, 6% BSA, 0,1mM Tris-HCl Puffer, PH 7,4 5,0ml resuspendiert und beschallt (Branson Sonifier, Mikro-Tip, 30W, 3 Minuten).

Elektrophorese der LDH- und GOT-Isoenzyme (Wieme, 1970)

Proben wurden mit 1,2%iger Agarose (Seakem ME) mit 50mM Barbital Na/HCl Puffer (PH 8,4) im Verhältnis 2:1 bei 45°C gemischt und jeweils 10µl dieses Gemisches wurden in die Auftragungsschlitze des 1,2%igen Agarose (Seakem ME)-Trägers eingefüllt. Danach wurden die mit der Probe gefüllten Schlitze mit einigen Tropfen 1,2% Agaroselösung bedeckt. Die Elektrophorese wurde bei LDH 90 Minuten bei 200V, bei GOT 60 Minuten bei 125V durchgeführt.

Zur Färbung auf LDH wurde 5 Minuten vor Beendigung der Elektrophorese aus 25,2ml der Stammlösung I (1,5ml Natrium-Lactat, 25mg Nitroblautetrazoliumchlorid, 50mg Natriumcyanid in 90ml 0,1M Phosphatpuffer PH 7,4), 0,7ml der Stammlösung II (10mg Phenazin-Methosulfat in 10ml Aqua bidest.) und 28mg NAD die Reaktionslösung hergestellt. Die Träger wurden in jeweils 4ml dieser Reaktionslösung bei 37°C 30 min. inkubiert. Nach der Färbung wurden sie in 5%iger alkoholischer Essigsäure fixiert, 2 Stunden in Aqua dest. gewässert und anschließend bei 40°C getrocknet. (modifizierte Methode von Van der Helm, 1961)

Für die Färbung der GOT-Isoenzyme wurde eine modifizierte Methode (Sandwich Methode), nach Ojala (1977) verwendet.
6 Substrat Gele wurden aus 16ml 3%iger Agar-Lösung (OXOID Agar, Nr.3, L 13), 16ml Substrat Puffer (100mM Tris, 200mM L-Asparat,

24mM α-Oxoglutarat, 10mM Na-EDTA, 3% PVP40) und 0,83mg Pyridoxalphosphat hergestellt. Nach der Elektrophorese wurde ein Substrat-Gel auf das Agarosegel geschichtet, in eine feuchte Schale gelegt und bei 37°C 10 Minuten lang inkubiert. 3 Minuten vor dem Inkubationsende wurde ein Stück Filterpapier in der Größe des Gelträgers zugeschnitten und mit 0,5ml 4%iger Fast-Violet-Blau-Lösung befeuchtet. Nach der Inkubation wurde das Substrat-Gel abgezogen, dann sofort das Agarosegel mit dem mit Fast-Violet-Blau befeuchteten Filterpapier bedeckt und erneut wieder bei 37°C 10 Minuten lang in der feuchten Schale inkubiert. Nach dem Entstehen der Farbe wurde das Filterpapier abgenommen, das Agarosegel in 5%iger Essigsäure 30 Minuten lang fixiert und 90 Minuten lang im Aqua dest. gewässert.
Hierzu wurden die Chemikalien von Sigma (München) verwendet.

Zur Aufzeichnung der Pherogramme wurde das Chromatogrammspektrophotometer der Fa. Zeiss in Verbindung mit einem W+W-Schreiber 1100 verwendet. Die Aufzeichnung der Protein-Elektrophorese erfolgte bei 610nm bzw. zur Erfassung des Albuminpeaks bei 428nm (Wellenlängeumrechnungsfaktor: 3,71), sonst bei 550nm.

Die Auswertung der Pherogramme des Proteins wurde mit einem von Siegert und Siemes (1977) modifizierten Analogrechner vorgenommen.

2.9. Raketen-Immun-Elektrophorese

Für den Nachweis von IgM wurde eine Raketen-Immun-Elektrophorese nach einer Modifikation von Laurell (1966) durchgeführt.

10ml 1,1%ige Agarose L (LKB) im Puffer (75mM Barbital, 75mM Tris, 50µM $MgCl_2$, 50µM $CaCl_2$, PH 8,4) wurde mit 1ml 10%igem Anti-Maus-IgM (aus der Ziege, Meloy) bei 50°C gemischt, dann wurde diese gemischte Agarose-Lösung auf die 100 x 75 mm geschnittene Gelbond-Folie (FMC Corporation, Marine Colloid Division) gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurden Löcher von 2,5mm Durchmesser gestanzt, in die jeweils 5µl der verdünnten Plasmaproben eingefüllt wurden. Die Elektrophorese wurde bei 2,5V/cm über Nacht durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde in der Färbelösung (0,1% Coomassie Blue R 250, 50% Methanol, 10% Essig) 1 Stunde gefärbt und danach mit 10% Essig, 50% Methanol 10 Minuten lang entfärbt.

2.10. Berenil-Behandlung

Berenil-Behandlung nach langer Infektionsdauer

Die mit chronischen T.congolense ($1x10^6$ Tryp./Maus) infizierten Mäuse bzw. Kontrolltiere wurden 30 Tage nach dem Infektionsbeginn mit zunächst 7mg Berenil/kg Körpergewicht behandelt, einer Dosis, die üblicherweise ausreicht, um alle Trypanosomen zu eliminieren. Da 2 Tage nach dieser Behandlung immer noch T.congolense im Blut der meisten infizierten Mäuse nachgewiesen werden konnten, wurden ihnen noch einmal 35mg Berenil/kg i.p. injiziert. Auch die Kontrolltiere erhielten entsprechende Berenilgaben. Danach wurden die gleichen Untersuchungen wie vor der Berenilbehandlung in definierten Zeit-Abständen durchgeführt.

Berenil-Behandlung nach kurzer Infektionsdauer

Der Versuch mit einer Berenil-Behandlung bei langer Infektionsdauer zeigt, daß Berenil bei ca. 50% der Mäuse nicht zu einer dauerhaften Trypanosomen-Eliminierung führte, und daß mit dem Wiederauftreten der Parasiten dieselben pathologischen Veränderungen festzustellen waren wie vor der Behandlung. Deshalb wurde zusätzlich eine Berenil-Behandlung am 5.Tag p.i. durchgeführt, um festzustellen, ob durch diese frühzeitige Berenilgabe eine dauerhafte Parasiteneliminierung erreicht werden kann.

Zuerst wurden 10 Mäuse mit 5 verschiedenen Dosen des chronisch infizierenden T.congolense-Stamms ($5x10^5$, $1x10^6$, $5x10^6$, $7,5x10^6$, $1x10^7$ Tryp.) angeimpft. Trotz der unterschiedlichen Infektionsdosen erreichte die Parasitämie bei allen infizierten Mäusen am 5.Tag nach der Infektion Werte über $1x10^8$ Tryp./ml Blut. 10 infizierte Mäuse wurden nun mit 35mg Berenil/kg i.p. behandelt. Nach der Berenilgabe wurde peripheres Blut zweimal pro Woche ca. 5 Monate lang bei einzelnen infizierten Mäusen auf Parasiten untersucht.

2.11. Statistische Analyse

Die Daten von der Gruppe mit über 4 Mäusen wurden zur Differenzierung durch t-Test geprüft. Die biometrische Sicherheit wird folgendermaßen angegeben (Weber, 1980):

Irrtumswahrscheinlichkeit: * : $P \leq 5,0\%$
** : $P \leq 1,0\%$
***: $P \leq 0,1\%$

3. Ergebnisse

3.1. Chronische T.congolense Infektion

3.1.1. Untersuchungen während der chronischen Infektion an Mäusen (Stamm: T.C. 4905)

Um den Einfluß der chronischen T.congolense-Infektion auf Mäuse zu charakterisieren, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

a) Parasitämieverlauf
b) Hämatologische Untersuchungen
c) Plasmaproteine (1. Gesamtprotein, 2. Elektrophorese der Plasmaproteine, 3. Raketen-Immun-Elektrophorese für IgM)
d) Bestimmung von Stoffwechselprodukten
e) Enzymaktivitäten (1. Gesamtaktivitäten, 2. Isoenzyme von LDH und GOT)
f) Körper- und Gewebs-Gewichte
g) Lysosomale Enzyme an Gewebeschnitten

a) Parasitämieverlauf

Der Parasitämieverlauf bei Mäusen ist aus der Abb.2 ersichtlich. Man beobachtet das typische Auf und Ab der Parasitämie im Blut. Bereits am 3.Tag nach der Infektion konnten im peripheren Blut durchschnittlich $7x10^6$ Trypanosomen/ml (min. $1,5x10^6$ Tryp./ml, max. $1,0x10^7$ Tryp./ml) nachgewiesen werden. Die Parasitämiekonzentration sank am 7.Tag p.i. auf $3,3x10^6$ Tryp./ml ab, und stieg anschließend wieder an. Ca. 7 Tage nach dem ersten Parasitämieminimum erreichte die Parasitämie einen Gipfel mit $3,5x10^7$ Tryp./ml. Dabach folgte ein ähnliches Auf und Ab bis zum Ende des Meßzeitraums.

Die Parasitämien von infizierten Mäusen ($5x10^5$ Tryp.) wurden alle 2 oder 3 Tage einen Monat lang ausgezählt, um festzustellen, in welchen Abständen die Parasitämiegipfel während der chronischen Infektion auftreten. Es ergab sich, daß jede infizierte Maus einen eigenen Abstand von zwischen 5 und 18 Tagen hat, aber übereinstimmend trat bei allen infizierten Mäusen der erste Parasitämiepeak am 3. oder 4.Tag p.i. und das erste Parasitämietal zwischen dem 6. und 8. Tag p.i. auf (Abb.3).

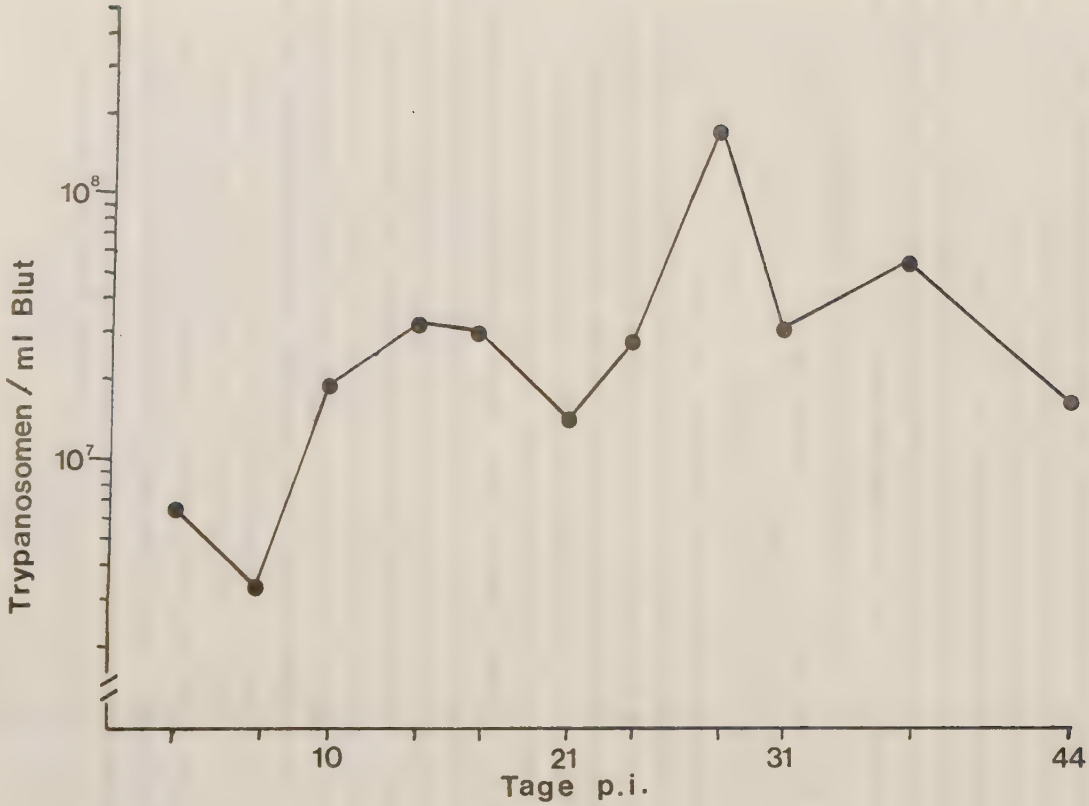


Abb.2: Mittlerer Parasitämieverlauf während der chronischen Infektion an Mäusen

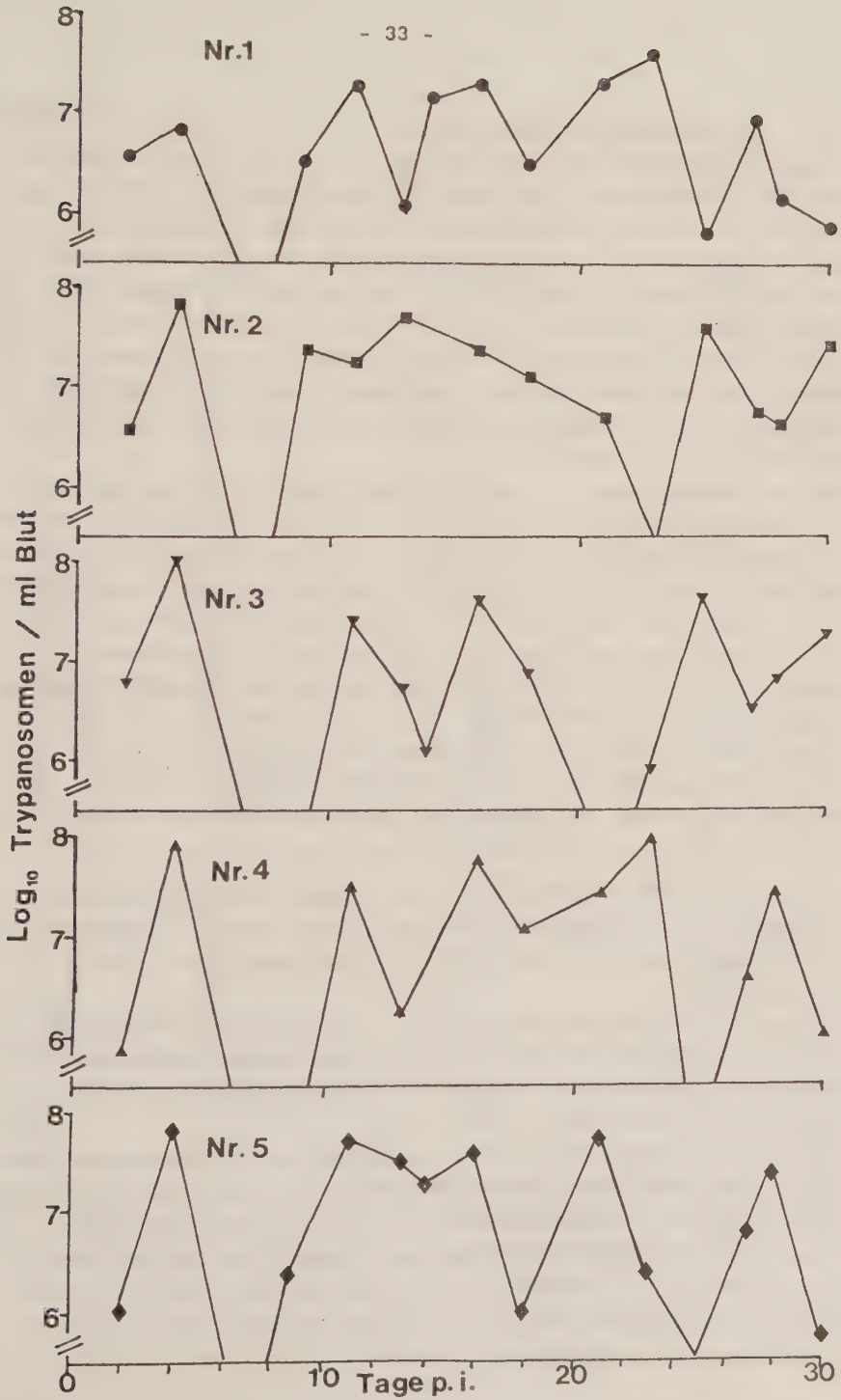


Abb.3: Parasitämieverlauf einzelner chronisch infizierter Mäuse(Nr.1-5)

b) Hämatologische Untersuchungen

Hämoglobingehalte und Hämatokritwerte sind der Abb.4 zu entnehmen. Hämoglobingehalt bzw. Hämatokritwert waren bei den infizierten Mäusen über den gesamten Zeitraum geringer als bei den Kontrollen. Der Abfall des Hämoglobingehaltes begann bereits am 3.Tag und betrug zwischen 10% und 30%. Eine verstärkte Abnahme von Hämoglobin und Hämatokrit war in der Zeit des Parasitämiegipfels (14-17 Tage) zu beobachten, danach blieben beide Parameter unverändert auf dem selben Niveau. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß die mit T.congolense chronisch infizierten Mäuse ständig an leichter Anämie leiden.

Um den Einfluß der chronischen T.congolense-Infektion auf die Hämolyseneigung der Erythrozyten zu untersuchen, wurden Versuche zur Veränderung der osmotischen Resistenz der Erythrozyten durchgeführt. 8 Tage nach der Infektion, vor dem zweiten Parasitämiegipfel, war nur ein kleiner Unterschied der osmotischen Resistenz der Erythrozyten zwischen Kontrollen und infizierten Mäusen zu sehen (Abb.5). Ab 17.Tag p.i., nach dem zweiten Parasitämiegipfel, zeigten die infizierten Mäuse eine deutlich schwächere Resistenz ihrer Erythrozyten (50%ige Hämolyse bei 0,56% NaCl: bei den Kontrollen; 50%ige Hämolyse bei 0,62-0,66% NaCl bei den infizierten Mäusen). Gegenüber den Kontrollen waren die Erythrozyten in den infizierten Tieren empfindlicher gegen Hämolyse.

Zusätzlich wurde ein Vergleich des weißen Blutbildes und des Differentialblutbildes zwischen Kontrollen und ca. 4 Monate lang mit T.congolense infizierten Mäusen (Impfmenge: $5x10^5$ Tryp.) durchgeführt.

Schon bei der Blutabnahme fiel auf, daß zwischen infizierten Tieren und Kontrollen Unterschiede in der Gerinnungsfähigkeit auftraten. Deshalb wurden außerdem Thrombozytenzahl und Gerinnungszeit gemessen.

Wie schon die Hämatokritwerte im Verlauf der T.congolense Infektion eine abfallende Tendenz zeigten, sank auch die Erythrozytenzahl um 18% ab. Außerdem hatten die infizierten Mäuse während hoher Parasitämien im Blut weniger Erythrozyten als die infizierten Mäuse, in deren Blut keine Trypanosomen direkt zu sehen waren. Im Blutausstrich von infizierten Mäusen waren viele Erythroblasten zu beobachten.

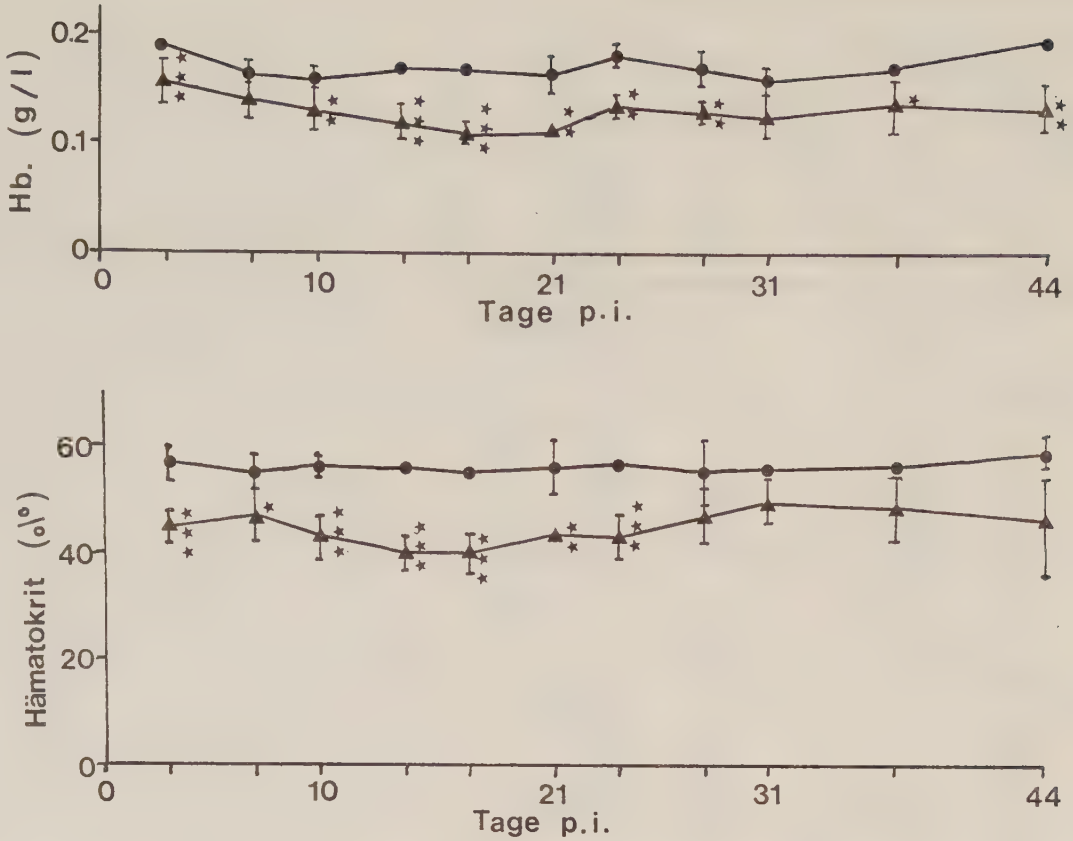


Abb.4: Hämoglobin- und Hämatokritverlauf während der chronischen Infektion an Mäusen
●—●: Kontrolltiere, ▲—▲: infizierte Tiere, *: $P \leq 5\%$, **$P \leq 1\%$, ***$P \leq 0.1\%$

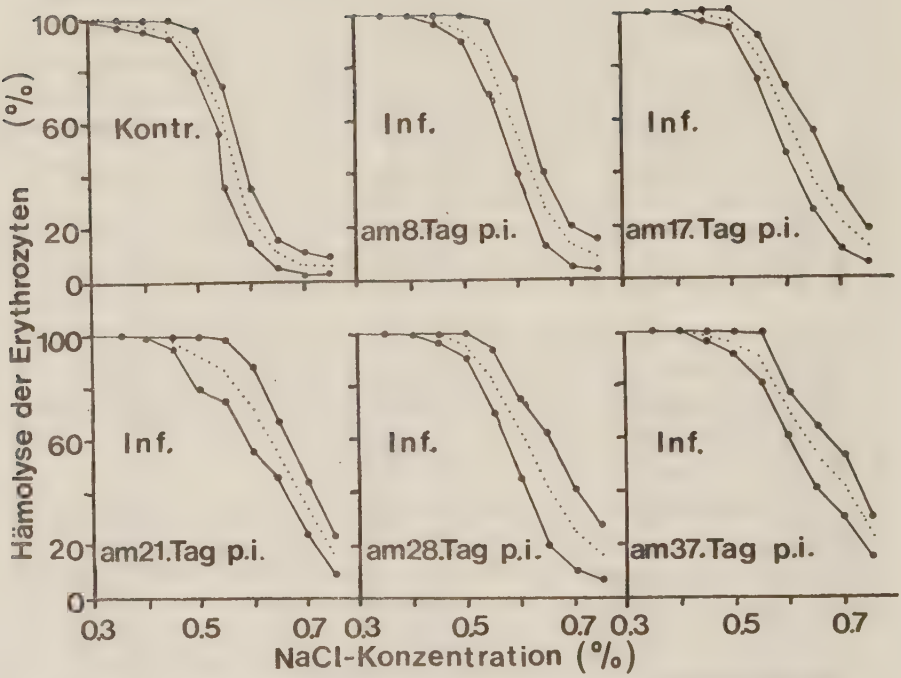


Abb.5: Veränderung der osmotischen Resistenz der Mäuse-Erythrozyten während der chronischen Infektion
●—●: minimale und maximale Werte, ----: Mittelwerte

Die Leukozytenzahlen der Kontrollen bzw. infizierter Tiere schwankten individuell beträchtlich, trotzdem ließ sich eine Zunahme der Leukozytenzahl bei den infizierten Mäusen um das ca. 2.8-fache zeigen.

Die Ergebnisse der gleichzeitig gemessenen Globalteste für das Blutgerinnungssystem zeigten einen großen Unterschied zwischen Kontrollen und infizierten Mäusen. Die Gerinnungszeit verlängerte sich von 2 Minuten bei den Kontrollen auf 5 Minuten bei den infizierten Tieren. Auch fiel die Thrombozytenanzahl bei den infizierten Mäusen unter die Hälfte der Kontrollen ab. Daraus geht hervor, daß die Blutgerinnung der infizierten Mäuse gestört ist (Tab.2).

	Kontr.	Inf.
Erythrozyten (10^6/µl)	7,18±0,087	5,94±0,645**
Leukozyten (10^3/µl)	8,88±0,886	25,11±8,660**
Thrombozyten (10^6/µl)	1,06±0,149	0,44±0,176**
Gerinnungszeit (Min.)	2,0±0,5	5,0±0,5**

Tab.2: Erythrozyten-, Leukozyten-, Thrombozytenanzahl und Gerinnungszeit bei Kontrollen und infizierten Mäusen
**: $P \leq 1\%$

Bei dem relativen und absoluten Differentialblutbild (Tab.3) waren einige typische Tendenzen abzulesen. Bei allen infizierten Tieren stiegen sowohl die Prozentanteile der Monozyten als auch die absoluten Monozytenzahlen, während analog die Prozentanteile der Lymphozyten, und die absoluten Lymphozytenzahlen absanken. Der Prozentanteil der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten war wenig verschieden bei Kontrollen und infizierten Tieren. Absolut gesehen jedoch enthielt das infizierte Blut doppelt soviel dieser Zellen wie das Kontroll-Blut. Die eosinophilen Granulozyten erhöhten sich nur bei infizierten Mäusen ohne Trypanosomen prozentual und absolut. Die infizierten Mäuse mit Trypanosomen zeigten dabei einen niedrigen Prozentanteil, aber die Gesamtzahlen eosinophiler Granulozyten bei Kontrollen und infizierten Tieren zeigten keinen so großen Unterschied.

		Kontr.	Inf. Nr.1$^+$	Nr.2$^+$	Nr.3$^-$	Nr.4$^-$	Nr.5$^-$
stabkernige neutrophile Granulozyten	%	2,31±1,26	10	2	4	3	1
	(a)	0,20±0,11	2,9	0,6	1,3	0,5	0,2
segmentkernige neutrophile Granulozyten	%	23,72±0,50	11	25	28	29	28
	(a)	2,11±0,04	3,2	8,0	9,2	4,4	4,6
eosinophile Granulozyten	%	7,73±3,86	2	4	27	16	27
	(a)	0,69±0,34	0,6	1,1	8,9	2,4	4,5
Monozyten	%	5,01±2,16	70	59	18	15	20
	(a)	0,45±0,19	20,3	18,9	5,9	2,3	3,3
Lymphozyten	%	61,30±3,50	7	10	23	27	24
	(a)	5,45±0,31	2,0	3,2	7,6	4,1	4,0

Tab.3: Differentialblutbild der Leukozyten bei der chronischen Infektion an Mäusen
(a): Anzahl ($10^3/\mu l$), +: Trypanosomen im Blut, -: keine Trypanosomen im Blut

c) Plasmaprotein

Gesamtprotein im Plasma

Die Situation in Bezug auf den Proteingehalt im ersten Drittel der Infektion war schwer auszuwerten. Zwar war eine gewisse Tendenz zur Zunahme des Proteingehalts zu erkennen, aber auf Grund zu starker Schwankungen statistisch nicht nachzuweisen. Erst vom 24.Tag p.i. an bis zum Meßzeitraumende blieb die Proteinkonzentration mit statistischer Signifikanz erhöht (Abb.6).

Elektrophorese der Plasmaproteine

Um Aussagen über die Veränderungen der Plasma-Proteinfraktionen bei der chronischen T.congolense-Infektion zu gewinnen, wurden elektrophoretische Analysen durchgeführt. Die Konzentration und die Positionen der Proteinfraktionen bei den infizierten Mäusen wurden mit denen der Kontroll-Mäuse verglichen und ausgewertet.

In der Abb.7 ist die Analogrechnerauswertung des Plasma-Pherogramms von einer Kontroll- und einer infizierten Maus dargestellt.

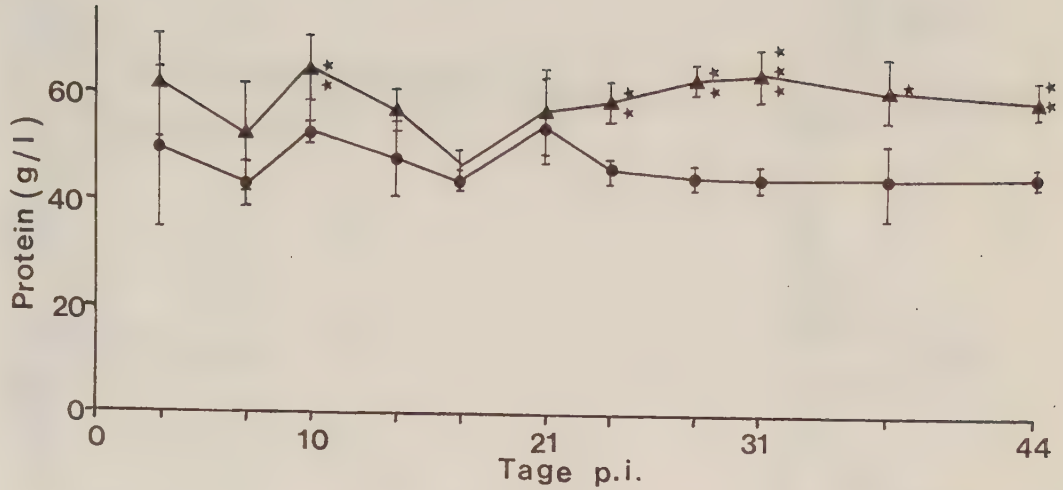


Abb.6: Gesamtproteingehalt im Plasma während der chronischen Infektion an Mäusen
●—●: Kontrolltiere, ▲—▲: infizierte Tiere, ★: s. Abb.4

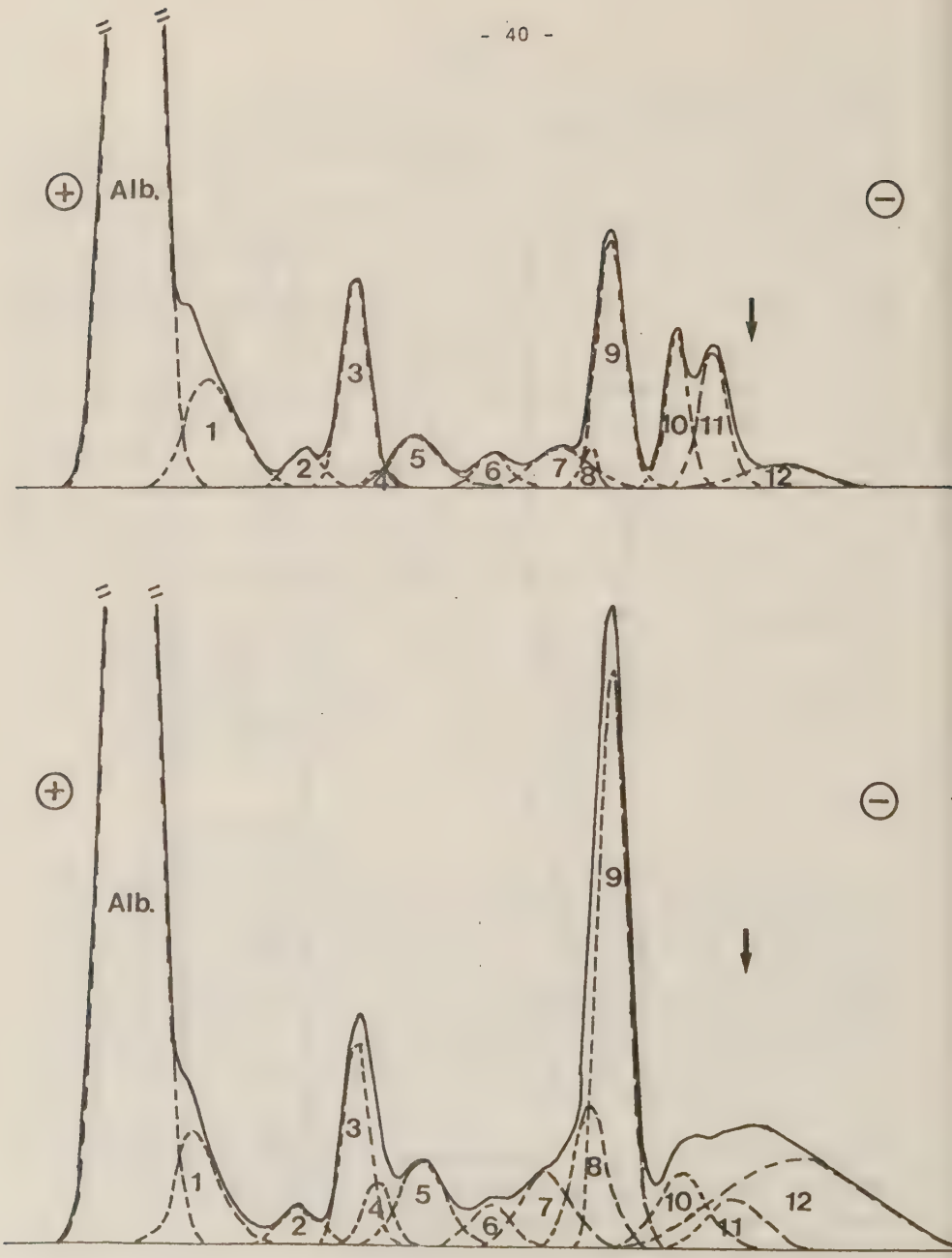


Abb.7: Pherogramme der Plasmaproteine einer Kontroll-(oben) und infizierten Maus (unten), am 44.Tag p.i.
↓: Auftragungsstelle, ——: ausgewertete Pherogramme, ----: mit Analogrechner ausgewertete Fraktionen

Maus-Plasma wurde in Albumin und 12 weitere Fraktionen aufgeteilt. Vergleicht man die beiden Pherogramme miteinander, bemerkt man schon eine relativ deutlichen Zunahme einiger Fraktionen (Nr.4, 8, 9, 12) und breitere Peaks von Fr. 10, 11 der infizierten Mäuse gegenüber den Kontrollen. Aber wie in Tab.4 gezeigt wird, schwanken die Werte sowohl der Kontrollen als auch der infizierten Mäuse ziemlich stark. Der Abfall des Albumins, der bei der Trypanosomiasis häufig beobachtet wird, war nicht nachzuweisen. Aber trotzdem wurden eine mäßige Zunahme von Fr. 5, 6, 7 und eine starke Zunahme von Fr. 4, 8, 9, 12 mit signifikantem Unterschied festgestellt. Dagegen zeigte Fr. 11 eine mäßig abnehmende Tendenz. Die Zunahme von Fr. 4, 8 und Fr. 9 trat bereits am 3.Tag nach der Infektion deutlich auf und blieb auf gleichem Niveau bis zum Ende des Untersuchungszeitraums. Zwar stieg der absolute Wert der Fr. 12 bereits am 3.Tag p.i. an, aber ihre Zunahme am 3.Tag war kleiner als die im späteren Stadium der Infektion.

Raketen-Immun-Elektrophorese für IgM

Mit Plasma aus verschiedenen Zeitpunkten der chronischen Infektion wurde eine Raketen-Immun-Elektrophorese auf IgM durchgeführt. Damit konnte nur eine relative IgM-Konzentration bestimmt werden, weil Maus-IgM als Standard nicht zur Verfügung stand. Zu jedem Zeitpunkt wurde Plasma aus Kontroll- und infizierten Tieren gleichzeitig analysiert. Die durchschnittlichen Länge der Raketen des Kontroll- und infizierten Plasmas werden in Abb.8 dargestellt.

Bereits am 3.Tag nach der Infektion stiegen die IgM auf das 2-3 fache an, noch deutlicher war die Zunahme von IgM am 7.Tag p.i., an dem das erste Parasitämietal auftrat. Zwischen 10. und 17.Tag p.i., während denen eine höhere Parasitämie als am 7.Tag nach gewiesen wurde, hatten die infizierten Mäuse selbst unter Berücksichtigung der individuellen Schwankung niedrigere IgM-Werte als die am 7.Tag p.i.. Aber danach teilten sich die infizierten Mäuse in eine Gruppe mit sehr erhöhtem IgM-Wert und eine zweite mit relativ niedrigem IgM-Wert. Deswegen waren die Standardabweichungen ziemlich groß (Diese Tendenz war vom 21.Tag bis zum 28.Tag außerordentlich groß).

Fr. Nr.	A (cm)	kontr. (g/l)	Inf. (g/l)
Alb.	4,91	32,7±9,49	39,9±1,63
1	4,05	2,62±1,39	2,62±1,39
2	3,59	0,60±0,16	0,84±0,38
3	3,16	2,18±0,70	2,81±0,71
4	2,96	0,07±0,02	0,90±0,31***
5	2,65	0,81±0,37	1,50±0,27 *
6	2,10	0,51±0,03	0,89±0,30 *
7	1,59	0,80±0,36	1,79±0,37**
8	1,36	0,55±0,18	1,83±0,35***
9	1,17	2,70±0,83	5,79±0,96**
10	0,66	0,97±0,32	1,17±0,31
11	0,43	1,24±0,54	0,32±0,10 *
12	-0,12	0,63±0,29	4,47±0,77***

Tab.4: Quantitative Auswertung der einzelnen Plasmaprotein-fraktionen aus Kontrollen und infizierten Mäusen
A: Abstand von Auftragungsstelle (cm), *: $P \leq 5\%$, **: $P \leq 1\%$, ***: $P \leq 0.1\%$

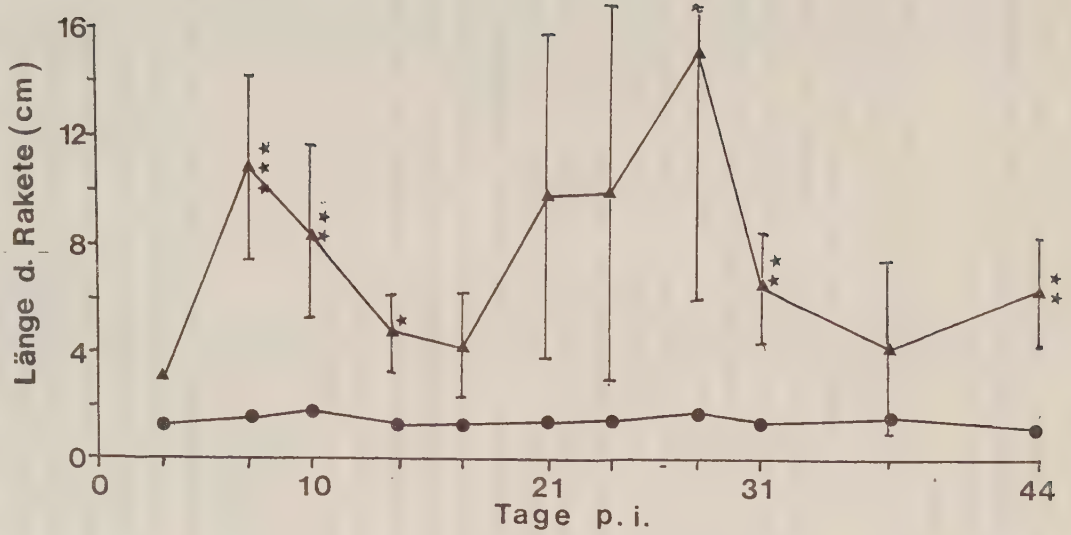


Abb.8: IgM-Veränderungen im Plasma im Verlauf der chronischen Infektion an Mäusen
●——●: Kontrolltiere, ▲——▲: infizierte Tiere, ★: s. Abb.4

d) Bestimmung von Harnstoff, Glukose und Gesamtbilirubin im Plasma

Die Werte für Harnstoff und Glukose im Maus-Plasma während der chronischen Infektion sind in Abb.9 dargestellt. Die Gesamtbilirubin-Werte der Kontrollen bzw. der infizierten Tiere schwankten sowohl innerhalb einer Gruppe am gleichen Versuchstag als auch während des Meßzeitraums so stark, daß diese Ergebnisse nicht auszuwerten waren.

Die Harnstoff- und Glukose-Konzentrationen im infizierten Plasma blieben erst bis zum 7. bzw. 10.Tag nach der Infektion unverändert. Danach verhielt sich die Harnstoffkonzentration gleichsinnig mit dem Parasitämieverlauf, während der Glukosekonzentrationsverlauf das umgekehrte Auf und Ab wie der Parasitämieverlauf zeigte. Auch beim Harnstoff trat der höchste Wert (3,5 fach höher als Kontrolle) am 28.Tag p.i. auf, die niedrigste Glukosekonzentration (60% Abnahme) wurde schon am 14.Tag p.i., an dem der erste Parasitämiegipfel auftrat, gemessen. Natürlich wurde die Abnahme der Glukose auch am 28.Tag p.i. mit der höchsten Trypanosomenanzahl beobachtet. Diese Befunde müssen mit Vorsicht betrachtet werden, da wegen starker individueller Schwankungen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Glukosewerten von infizierten und Kontroll-Tieren nachzuweisen war. Trotz keines signifikanten Unterschiedes in der mittleren Glukosekonzentration fiel der Glukosewert bei einzelnen infizierten Mäusen mit der Parasitämie über 10^8 Tryp./ml ab dem 10.Tag p.i. fast immer sehr stark ab.

e) Enzymaktivitäten

Gesamtaktivitäten im Plasma

Die Enzymaktivitätsverläufe von LDH, GOT, GPT und Alp bei den infizierten und den Kontroll-Mäusen sind in Abb.10-13 dargestellt. Außer Alp stiegen alle gemessenen Enzymaktivitäten der infizierten Mäuse in unterschiedlichem Maße an und blieben über den gesamten Meßzeitraum von 44 Tagen höher als bei den Kontroll-Tieren.

Die LDH-Aktivität (Abb.10) war bereits am 3.Tag p.i. schon ca.7 mal höher als bei den Kontrollen, nahm mit wenig Schwankung mäßig bis zum 28.Tag p.i. zu (außer am 17.Tag p.i.). Am 28.Tag, an dem die höchste Parasitämie im Verlauf der chronischen Infektion auftrat, wurde auch die höchste Aktivität von LDH gemessen. Zwar war

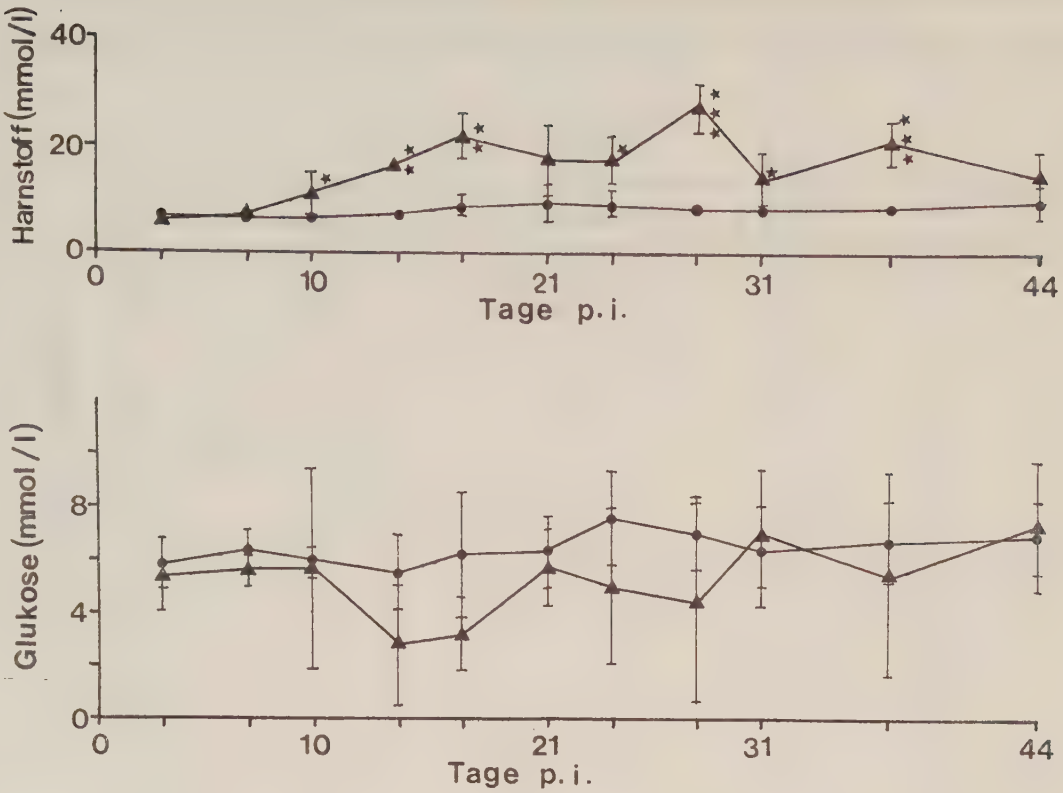


Abb.9: Harnstoff- und Glukosekonzentration im Plasma während der chronischen Infektion an Mäusen

●—●: Kontrolltiere, ▲—▲: infizierte Tiere, *: s. Abb.4

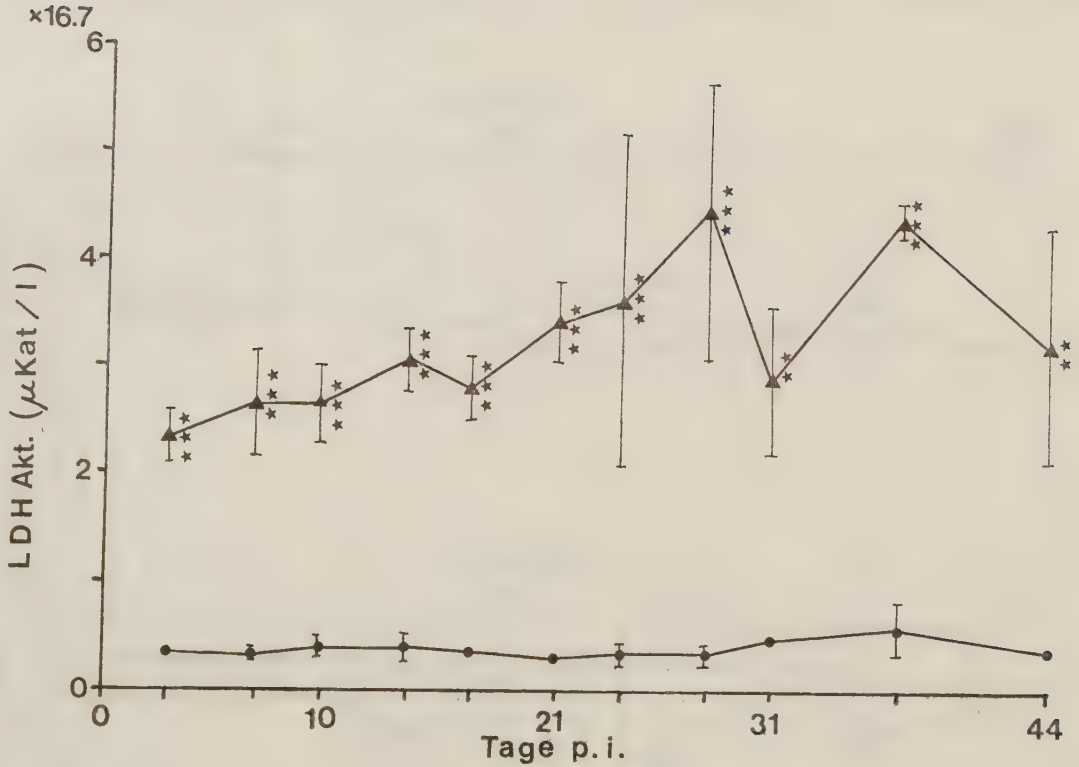


Abb.10: LDH-Aktivitätsverlauf im Plasma während der chronischen Infektion an Mäusen
●——●: Kontrolltiere, ▲——▲: infizierte Tiere, *: s. Abb.4

die LDH-Aktivität am 44.Tag p.i. niedriger als die am 37.Tag p.i., aber sie war immer noch ca. 9 mal höher als die bei Kontrollmäusen.

Die GOT-Enzymaktivität (Abb.11) verlief ziemlich analog der GPT-Enzymaktivität (Abb.12). Am 3.Tag p.i. trat bei infizierten Mäusen ein ca. doppelter Enzymaktivitätsanstieg auf. Danach blieben beide Aktivitäten bis zum 24.Tag p.i.auf ungefähr den doppelten Wert der Kontrollen erhöht. Wie die LDH-Enzymaktivität zeigte die GOT-Enzymaktivität den höchsten Wert gegenüber den Kontrollen (3 fach) am 28.Tag p.i., der stärkste Aktivitätsanstieg der GPT gegenüber den Kontrollen wurde am 44.Tag p.i. (ca. 3 fach) gemessen.

Bei der Alp-Aktivität (Abb.13) war kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und infizierten Mäusen während des Versuchszeitraums festzustellen

Isoenzyme von LDH und GOT

Um Hinweise darauf zu erhalten, welche Organe durch die T.congolense-Infektion geschädigt waren, wurden elektrophoretisch die Isoenzymmuster von LDH und GOT untersucht.

Anstiege der LDH- und GOT-Aktivitäten, die bei den hier durchgeführten Untersuchungen auftraten, sind bei Schädigung der Leber oder des Skelett- bzw. Herzmuskels zu erwarten.

LDH-Isoenzyme

Typische Pherogramme von Kontrollen und infizierten Mäusen am 28.Tag nach der Infektion sind in der Abb.14, die absolute und prozentuale Verteilung jedes LDH-Isoenzyms in der Tab.5 dargestellt. Starke Schwankungen der absoluten und prozentualen Mittelwerte waren sowohl bei den Kontroll- als auch bei den infizierten Tieren festzustellen (besonders LDH_1 und LDH_2 bei den Kontrollen, LDH_2 bei den infizierten Mäusen). Das Verhältnis der absoluten Werte "infizierte Tiere vs. Kontrolltiere" wurde als I/K dargestellt. Trotz der Schwankung waren folgende Tendenzen nachzuweisen:

Der absolute Wert jeder LDH-Isoenzymfraktion bei den infizierten Mäusen nahm gegenüber den Kontrolltieren in unterschiedlichem Maße zu. Besonders stark stieg LDH_5 an (sowohl absolut als auch prozentual). Die Zunahme der LDH_5-Aktivität der infizierten Mäuse

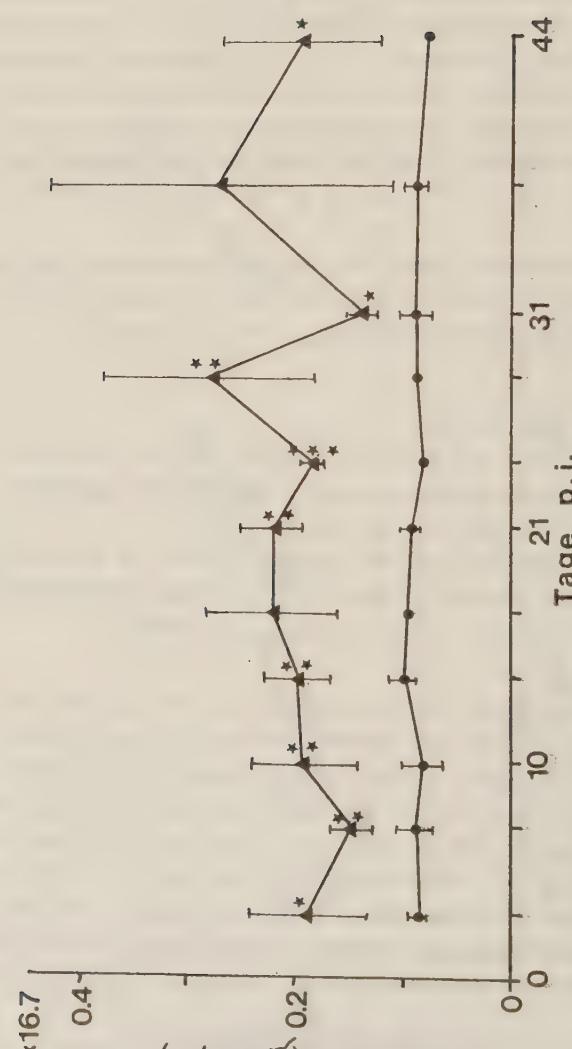


Abb.11: GOT-Aktivitätsverlauf im Plasma während der chronischen Infektion an Mäusen
●—●: Kontrolltiere, ▲—▲: infizierte Tiere, *: s. Abb.4

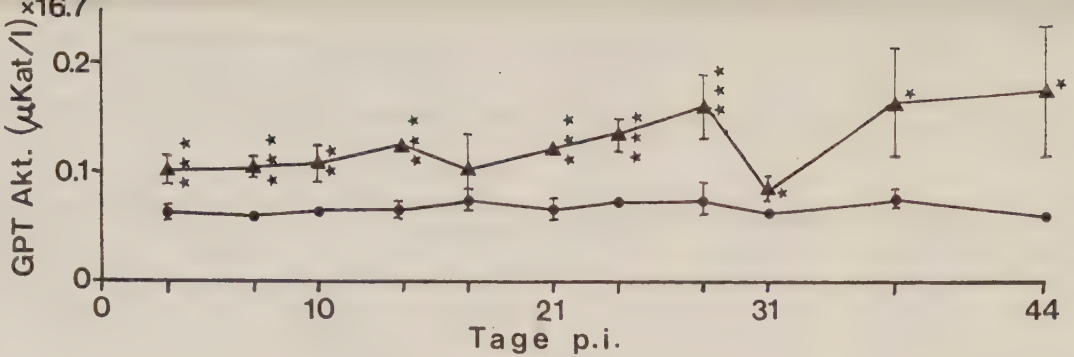


Abb.12

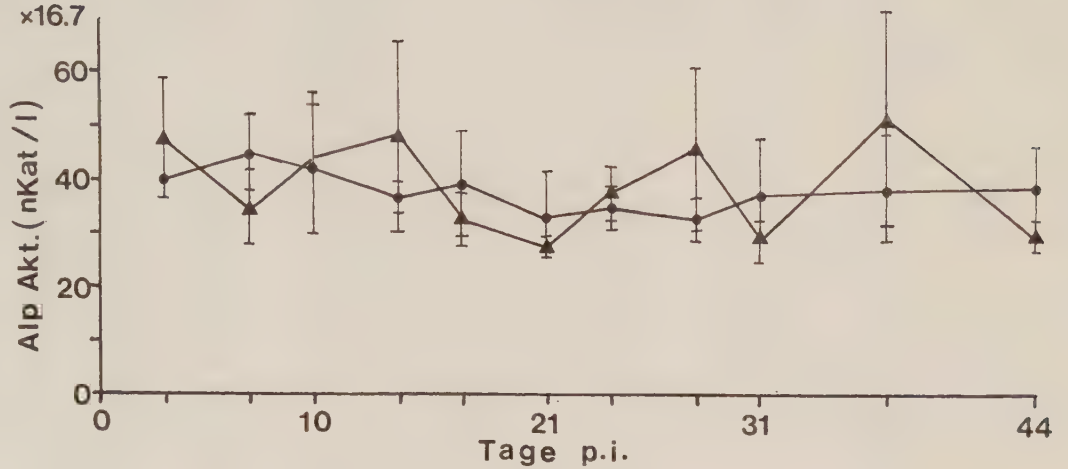


Abb.13

Abb.12 u. 13: GPT-und Alp-Aktivitätsverlauf im Plasma während der chronischen Infektion an Mäusen

●—●: Kontrolltiere, ▲—▲: infizierte Tiere, ★: s. Abb.4

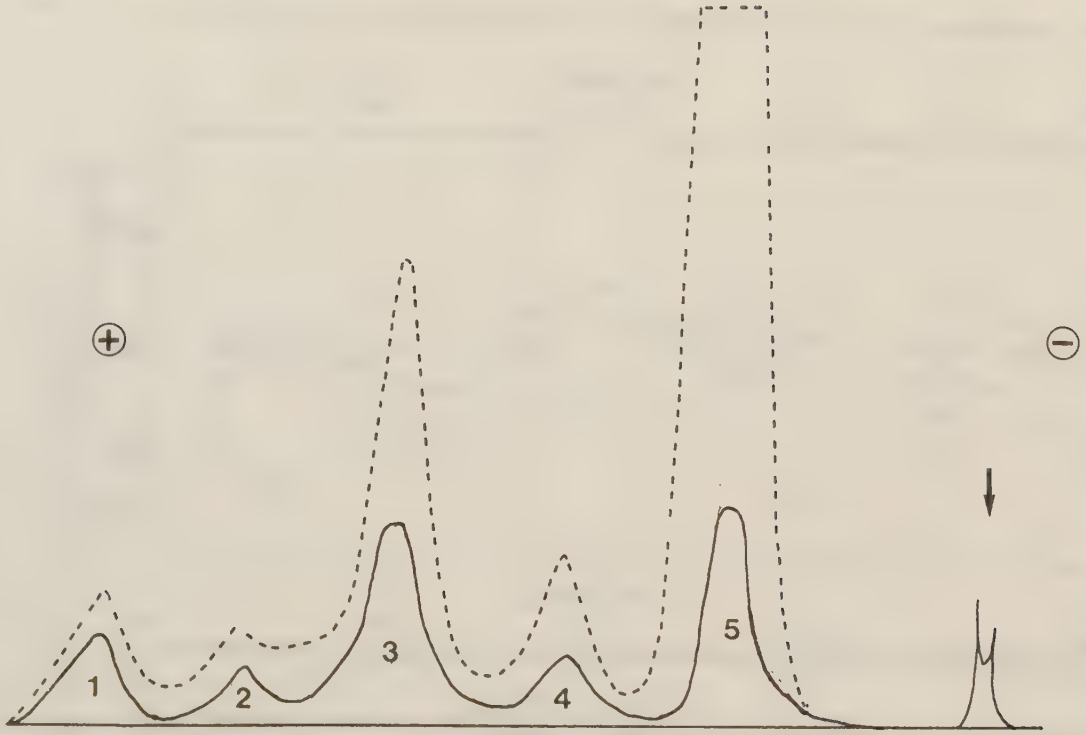


Abb.14: Pherogramme der LDH-Isoenzyme einer Kontrolle (——) und einer infizierten Maus (----)
↓: Auftragungsstelle, 1: LDH_1, 2: LDH_2, 3: LDH_3, 4: LDH_4, 5: LDH_5

	Absolute Werte (Akt./Fläche)			Prozentuale Werte(%)	
	Kontr.	Inf.	I/K	Kontr.	Inf.
LDH_1	1,09±0,417	2,37±0,551	2,2	18,7±3,46	4,1±1,01
LDH_2	0,88±0,346	6,08±1,737	6,9	16,5±4,81	9,0±1,39
LDH_3	1,92±0,316	15,16±2,722	7,9	33,9±1,34	24,9±1,92
LDH_4	0,57±0,032	3,96±0,668	6,9	10,3±2,69	7,6±1,02
LDH_5	1,14±0,002	31,6±6,931	27,9	20,4±4,17	54,3±4,74

Tab.5: Absolute und prozentuale Aktivität der LDH-Isoenzyme im Plasma aus Kontroll- und infizierten Mäusen (Akt.: µKat/l)

betrug durchschnittlich das 28-fache der Ausgangsaktivität. Dann folgte LDH_3 (8 fach), und danach LDH_2, LDH_4 in gleichem Ausmaß. Im Vergleich zu den anderen nahm der absolute Wert von LDH_1 der infizierten Mäuse nur auf das 2-fache zu. Im Extrakt der Leber und des Skelettmuskels der Mäuse traten hauptsächlich LDH_5 bzw. weniger LDH_4 auf. Daraus kann man schließen, daß die erhebliche Zunahme der LDH_5 bei den mit chronischen T.congolense infizierten Mäusen sehr wahrscheinlich auf entweder eine Schädigung der Leber oder / und des Skelettmuskels zurückzuführen ist. Die nicht sehr ausgeprägten Veränderungen im Bilirubin bzw. dem Albumin sprechen nicht gerade für Leber-Veränderungen.

GOT-Isoenzyme

GOT könnte im Gegensatz zu LDH sowohl aus Wirtsgewebe als auch aus Zellen der Parasiten stammen. Kilgour et al. (1975) stellten Transaminasen in T.vivax fest.

GOT-Aktivität wurde in einer beschallten T.congolense-Lösung ($3x10^9$ Tryp./ml) bemessen, ihre Aktivität betrug 21,6 µKat/l am 1.Tag und fiel mit der Aufbewahrungszeit der beschallten Parasiten stark ab.

Um festzustellen, ob die Zunahme der GOT-Aktivität bei den infizierten Mäusen an der GOT in T.congolense oder an den Gewebeschädigungen liegt, wurden Elektrophoresen auf GOT-Isoenzyme durchgeführt.

Wie Abb.15 zeigt, traten die GOT-Peaks aus Leber- und Herz-Extrakt (Cytoplasma) bei gleichen anodischen Positionen, die Mitochondriafraktionen der Leber und des Herzen bei gleichen kathodischen Positionen auf. Die GOT von T.congolense lief dagegen nur in die kathodische Richtung, etwas langsamer als die GOT-Peaks der anderen Extrakte. Bei den Pherogrammen mit Plasma-GOT wurde zwischen Kontrollen und infizierten Mäusen ein Unterschied in der kathodischen Peakposition beobachtet. Der kathodische GOT-Peak des infizierten Plasmas lief langsamer (unterschiedlich bei den einzelnen Individuen) als der der Kontrollen und war zwischen dem Organ-Mitochondrialfraktion-Peak und dem GOT-Peak der T.congolense verschmiert. Es ist denkbar, daß ein Teil dieses Peaks auf GOT aus T.congolense zurückzuführen ist. Anderseits stieg der anodische Peak aus infizierten Mäusen durchschnittlich um das 1.9-fache an, und unter dem kathodischen Peak verbirgt sich neben der T. congolense-GOT ja auch die aus der Leber und dem Herzen. Daraus läßt sich schließen, daß neben der GOT der T.congolense auch eine Schädigung der Leber und / oder des Herzen zur Erhöhung der GOT bei den infizierten Mäusen führt.

f) Körper- und Gewebs-Gewichte

Die Parasitämie zeigte das typische Auf und Ab im Verlauf der chronischen Infektion. Währenddessen nahm das Körpergewicht der infizierten Mäuse stärker zu als das der Kontrollen (Zunahme der Kontrollen 112%, Zunahme der infizierten Mäuse 148%, siehe Tab.6). Gleichzeitig mit der Körpergewichtszunahme wurde eine massive Veränderung an Milz und Leber beobachtet. Andererseits zeigte die Niere keine Gewichtsveränderung bis zum Versuchsende. Die Veränderungen der Milz- und Leber-Gewichte sind -bezogen auf das Körpergewicht- in Abb.16 dargestellt. Das Milzgewicht der infizierten Mäuse war bereits am 3.Tag p.i. mit signifikantem Unterschied größer (ca. 2 fach) als das der Kontrollen und nahm mit zunehmender Dauer der Infektion immer mehr zu. Am Ende des Untersuchungszeitraums (am 44.Tag p.i.) war das Milzgewicht auf das 12-fache gegenüber den Kontrollen angewachsen. Das Lebergewicht nahm nicht im selben Maße zu, sondern stieg nur auf etwa das Doppelte am 44. Tag p.i. an.

Bei der Auswertung der Körpergewichtszunahme muß Rücksicht auf

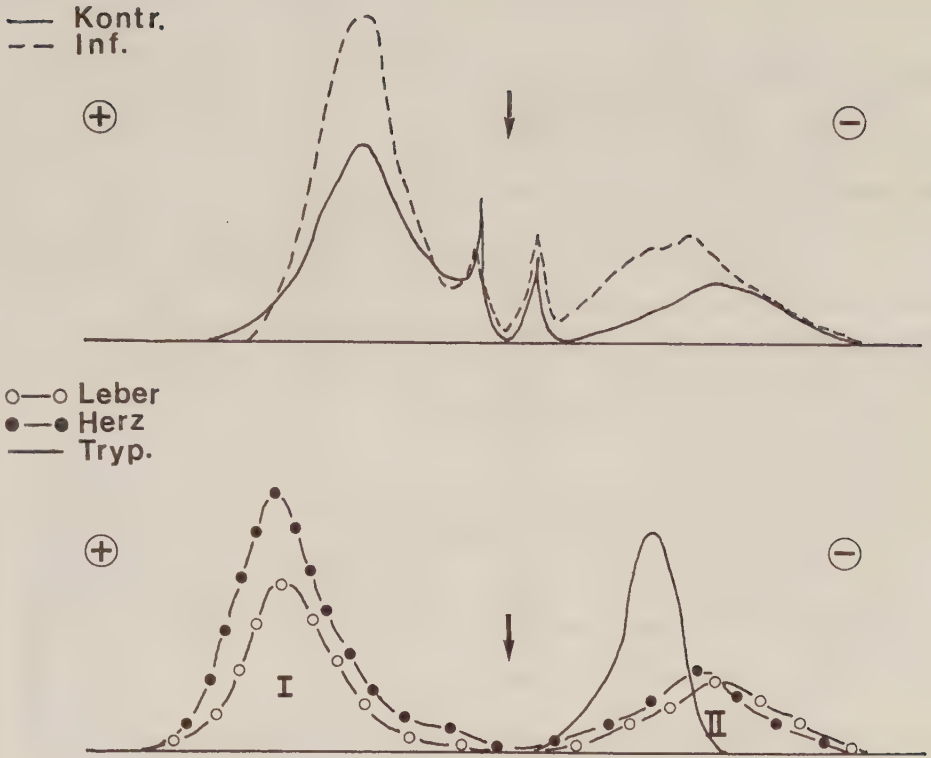


Abb.15 Pherogramme der GOT-Isoenzyme im Plasma einer Kontroll- und inzifierten Maus (oben), Trypanosomen und Mausgewebe (unten)
↓: Auftragungsstelle, I: GOT im Cytoplasma, II: GOT in den Mitochondrien

Tage p.i.	Körpergewicht (g) Kontr.	Inf.	A	B
3	26,0±2,00	26,2±4,92	0,73	25,5
7	23,9±1,79	26,5±4,03	2,22	24,3
10	25,8±0,69	30,9±2,55	3,52	27,4
14	25,7±2,34	32,3±5,56	4,85	27,5
17	24,2±2,83	27,5±2,99	6,77	20,7
21	28,2±1,71	31,3±5,42	6,95	24,4
24	29,1±2,61	33,1±2,27	8,80	24,3
28	26,2±1,44	30,6±3,87	8,54	22,1
31	29,0±0,64	35,6±1,15	6,08	29,5
37	26,5±0,70	35,1±1,28	9,19	25,9
44	29,1±1,32	38,7±2,51	10,36	28,3

Tab.6: Körpergewicht der Mäuse im Verlauf der chronischen Infektion
A: Die zunehmende Summe von Milz- und Leber-Gewicht der infizierten Mäuse, B: Körpergewicht der infizierten Mäuse korrigiert um die Zunahme der Milz- und Leber-Gewichte

die Veränderung an Milz und Leber genommen werden. Subtrahierte man die Milz- und Leber-Gewichte vom Körpergewicht (Tab.6, Spalte B), so ist kaum noch eine Zunahme des Körpergewichtes während der Infektion zu registrieren. Dies weist darauf hin, daß die Körpergewichtszunahme hauptsächlich auf die Zunahme der Leber- und Milz-Gewichte zurückzuführen ist.

g) Lysosomale Enzyme an Gewebeschnitten

Die histochemisch erfaßbare saure Phosphatase-Aktivität der Leberzellen wird bei den Kontroll-Mäusen in Form sehr kleiner Granula sichtbar, die in Reihen entlang den Gallenkapillaren angeordnet sind. Diese Granula enthalten Reaktionsprodukt in mäßiger Menge und werden als Lysosomen angesehen. Sinusoidassozierte Zellen mit zum Teil sternförmigen Fortsätzen enthalten im Cytoplasma größere

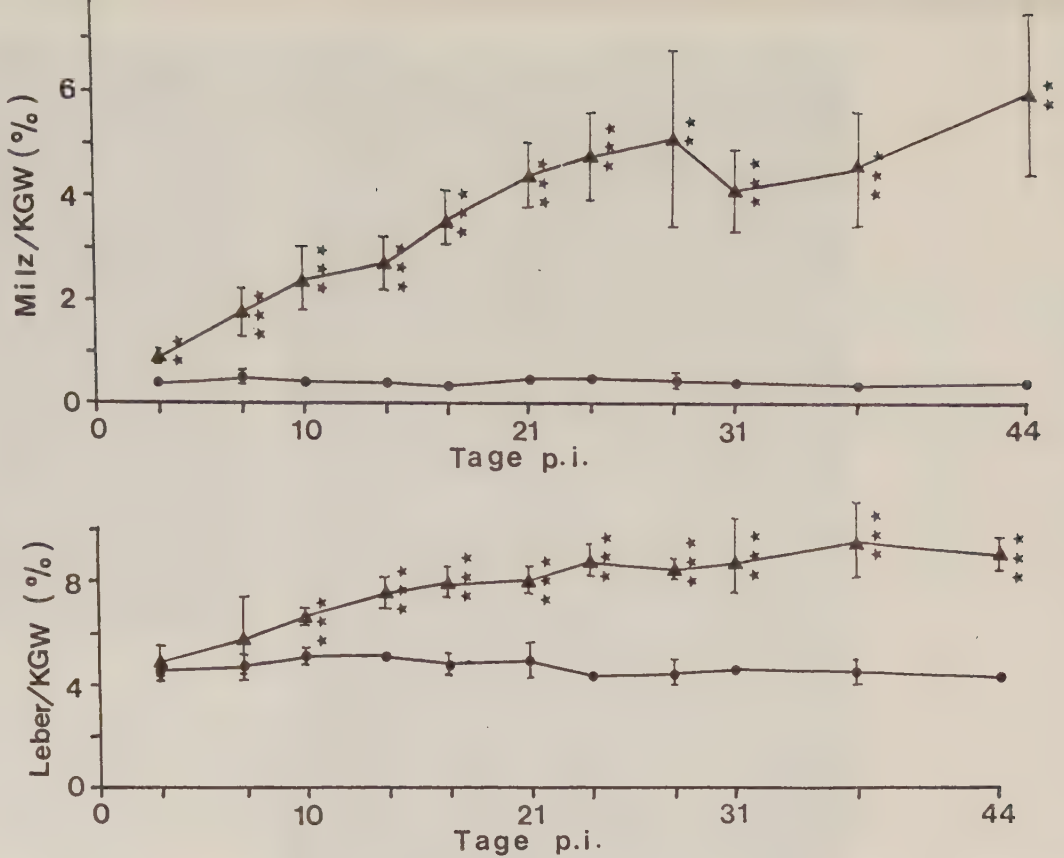


Abb.16: Auf das Körpergewicht bezogene Milz-(oben) und Lebergewichte (unten) während der chronischen Infektion an Mäusen

●—●: Kontrolltiere, ▲—▲: infizierte Tiere, *: s. Abb.4

aber ebenfalls nur mäßig saure Phosphatase-positive Granula. Diese Zellen werden als v.Kupffersche Zellen betrachtet. Die Zellkerne der Leberzellen und der v. Kupfferschen Zellen waren frei von Reaktionsprodukt.

Die infizierten Mäuse ließen bereits am 3.Tag p.i. deutlich eine Zunahme der Zahl der sinusoidassoziierten sternförmigen Zellen erkennen. Diese Zellen tendierten zur Abrundung und Vergrößerung. Das Cytoplasma war mit stark saure Phosphatase positiven großen Lysosomen vollgestopft. Diese Veränderungen betrafen vornehmlich die periportalen Felder. Ferner traten einzelne Herde stark saure Phosphatase-positiver Zellen in Leberparenchym auf. Größe und Aussehen dieser Zellen entsprechen dem der v. Kupfferschen Zellen. Es ist nicht zu entscheiden, ob an diesen Stellen eine Nekrose von Hepatozyten vorausgegangen ist. Im weiteren Verlauf der Infektion stieg die Zahl der v. Kupfferschen Zellen an, ihre Größe sowie die Zahl der Lysosomen und die Stärke der sauren Phosphatase-Aktivität nahmen ebenfalls zu. Diese Zellen zeigten fast alle abgerundete Form. In den Leberzellen lagen um die Gallenkapillaren kleine Lysosomen in Reihen, deren saure Phosphatase-Aktivität ebenfalls gegenüber den Kontrollen zunahm. Es war auch zu diesem Zeitpunkt der Infektion deutlich, daß die periportalen Felder von den beschriebenen Veränderungen stärker betroffen waren als die Gebiete um die Zentralvenen. Herdförmige Ansammlungen stark saure Phosphatase-aktiver Zellen waren weiterhin nachweisbar (Abb.17).

Der β-Glucuronidase-Nachweis ergab in Hepatozyten und v. Kupfferschen Zellen bei den Kontrollmäusen nur sehr geringe Aktivität in Form einzelner lysosomaler Granula. Die infizierten Mäuse ließen keine deutlichen Unterschiede gegenüber den Kontrollen bis zum 44.Tag p.i. erkennen.

Die Milz der Kontroll-Mäuse zeigte in den Zentren der Malpighischen Körperchen einzelene große "tingible body" Makrophagen mit stark saure Phosphatase positiven Einschlüssen. Dagegen waren in der roten Pulpa zahlreiche kleinere Makrophagen zu beobachten, die meist 2 bis 3 stark saure Phosphatase positive Lysosomen enthielten.

Die infizierten Mäuse ließen am 3.Tag p.i. hinsichtlich der sauren Phosphatase-Aktivität in der weißen Pulpa keine deutlichen Unterschiede im Vergleich mit den Kontrolltieren erkennen. In der roten Pulpa nahm jedoch die Zahl der Makrophagen ziemlich zu.

Die Zellen waren deutlich größer als bei den Kontrollen, und das Cytoplasma war mit zahlreichen saure Phosphatase positiven Lysosomen angefüllt. Im weiteren Verlauf der Infektion nahm das Volumen der roten Pulpa erheblich zu, und die beschriebenen Veränderungen verstärkten sich noch bis zum Ende des Infektionszeitraums(Abb.18).
Die Darstellung der β-Glucuronidase-Aktivität ließ sich an den Milzschnitten wegen starker Inhomogenität nicht auswerten.

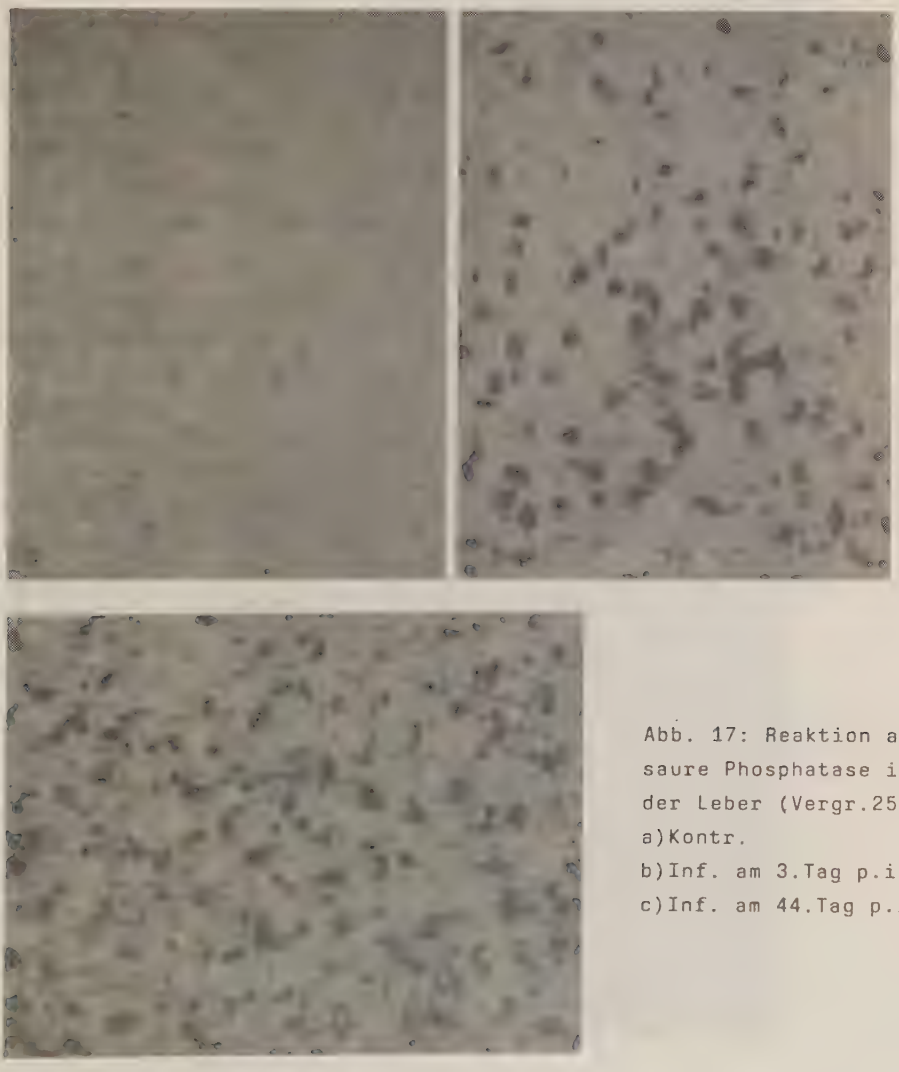


Abb. 17: Reaktion auf saure Phosphatase in der Leber (Vergr.250x)
a)Kontr.
b)Inf. am 3.Tag p.i.
c)Inf. am 44.Tag p.i.

Abb.18: Reaktion auf saure Phosphatase in der Milz (Vergr. 100x)
a) Kontrolle, b)Kontrolle+Berenil, c) infizierte Maus am 44.Tag p.i.

3.1.2. Einfluß von Berenil auf die Infektion

Berenil hat je nach Zeitpunkt der Therapie unterschiedliche Effekte. Wird es innerhalb einer Woche nach dem Infektionsbeginn verabreicht, so führt es zu einer dauerhaften Heilung, erfolgt die Berenilgabe erst zu einem späteren Zeitpunkt (ab zwei Wochen nach der Infektion), so zeigt es nur einen vorübergehenden positiven Effekt (Jennings et al., 1977). Aus diesem Grunde wurde die Wirkung von Berenil auf die Trypanosomeninfektion und die im obigen Teil beschriebenen Parameter sowohl nach kurzer (am 5.Tag p.i.) als auch nach langer Infektionsdauer (am 30.Tag p.i.) untersucht.

a) Berenil-Behandlung nach langer Infektionsdauer

Wie in "Material und Methode" beschrieben, wurde zweimal im Abstand von 2 Tagen Berenil gegeben.

Zusammenfassend kann zu den Ergebnissen der Berenil-Versuche gesagt werden:
Nach Berenilbehandlung normalisieren sich die meisten infektionsbedingten Veränderungen in den serologischen, hämatologischen, enzymatischen und histologischen Parametern schnell, treten bei neuen Parasitämie-Schüben allerdings auch sofort wieder auf. Erschwerend für die Beurteilung ist, daß Berenil selbst einige der gemessenen Parameter beeinflußt. Das ist der Grund für die im folgenden manchmal etwas komplizierte Nebeneinanderstellung von Kontrollen, (Berenil-) behandelten Kontrollen, infizierten- und (Berenil-) behandelten infizierten Tieren.

Parasitämieverlauf: Die Parasitämie fiel am 1.Tag nach der zweiten Berenilgabe (35mg/kg) bei allen behandelten infizierten Mäusen unter die Nachweisgrenze. Auch am 15.Tag nach der Berenil-Behandlung waren noch keine Trypanosomen im Blut zu finden, am 34.Tag traten jedoch in zwei von vier Mäusen wieder Parasiten im Blut auf ($8{,}25 \times 10^6$ Tryp./ml, $6{,}25 \times 10^6$ Tryp./ml). Das bedeutet, daß die Trypanosomen nach langer Infektionsdauer durch eine Berenil-Behandlung nicht auf Dauer eliminiert werden können, und dieser Befund steht auch im Einklang mit Erfahrungen aus der Praxis.

Hämatologische und biochemische Parameter: Die geänderten Hämoglobin-, Hämatokrit- und Harnstoffwerte im Verlauf der chronischen Infektion wurden am 3.Tag nach der zweiten Behandlung durch Berenil rückgängig gemacht (Abb.19). Diese positive Wirkung von Berenil auf den Hämoglobingehalt und die Harnstoffkonzentration dauerte mindestens bis zum 34.Tag nach der Berenilgabe, so lange keine Trypanosomen im Blut erschienen. Der Hämatokritwert der behandelten infizierten Mäuse ohne Trypanosomen im Blut war trotzdem niedriger als der der Kontrollen. Obwohl die behandelten Mäuse mit Trypanosomen am 34.Tag wieder eine abfallende Tendenz bei dem Hämoglobingehalt bzw. dem Hämatokritswert zeigten, blieb ihre Harnstoffkonzentration trotz der Anwesenheit von Parasiten auf dem Niveau des Kontrollwertes.

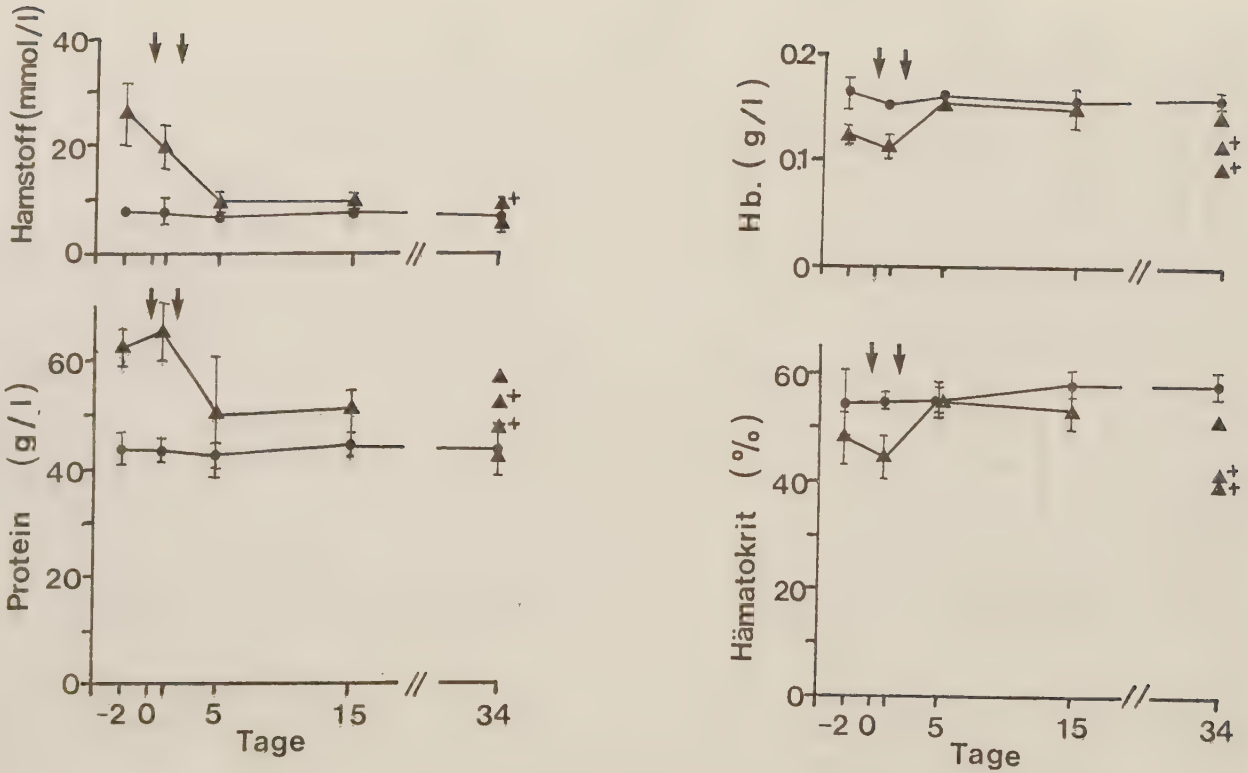


Abb.19: Hämoglobin-,Hämatokrit-,Harnstoff- und Protein-Veränderungen nach Berenil-Behandlung

●—●: Kontrolltiere, ▲—▲: infizierte Tiere + Berenil, ⇓: Berenilgabe, +: Trypanosomen im Blut

Die Normalisierung des Proteingehaltes (Abb.19) war bereits am 3.Tag nach der zweiten Berenilgabe erkennbar, aber die Proteinkonzentrationen der behandelten infizierten Mäuse blieben immer noch höher als die der Kontrollen. Beim Gesamtprotein war kein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Wiederauftreten der Trypanosomen und seinem Anstieg bis zum Ende des Versuchszeitraums gegeben.

Das Plasma der behandelten Kontroll- und infizierten Mäuse wurde elektrophoretisch analysiert (Abb.20, Tab.7). Zwar war eine Zunahme der Fraktion 4 bei den mit Berenil behandelten Kontroll-Mäusen gegenüber den Kontrollen mit signifikantem Unterschied festzustellen, aber sonst änderten sich keine anderen Proteinfraktionen durch Berenilgabe. Diese Fr. 4 besetzt bei den Kontrollen nur einen kleinen Teil des Gesamtproteins, deswegen war kein Anstieg des Gesamtproteins bei den behandelten Kontrolltieren gegenüber den Kontrollen nachzuweisen. Alle während der chronischen Infektion auftretenden Veränderungen an Proteinfraktionen (Fr. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, siehe Abb.7 und Tab.4), außer Fr. 4 und Fr. 12, wurden durch Berenil-Behandlung normalisiert. Obwohl Fr. 4 durch Berenil erhöht wurde, blieb der absolute Wert der Fr. 4 bei den behandelten infizierten Mäusen im Bereich des Wertes bei den infizierten Mäusen. Der absolute Wert der Fr. 12 der behandelten infizierten Mäuse war auch trotz der Berenilgabe immer noch doppelt so hoch wie der der Kontroll-Mäuse. Mit dem Wiederauftreten der Trypanosomen (am 34.Tag nach der Behandlung) trat der ausgeprägte Anstieg der Fr.9 (der bereits am 3.Tag nach der Infektion festzustellen war) bei den behandelten infizierten Mäusen wieder auf.

Nach der ersten Berenil-Behandlung nahm der IgM-Spiegel (Abb.21) rasch ab und stieg dann während der Abwesenheit der Trypanosomen im Blut (bis zum 15.Tag nach der Behandlung) stark an. Es ist nicht klar, ob dieser Abfall am 1.Tag nach der Berenilgabe nur durch Berenil verursacht war, weil der IgM-Wert der infizierten Mäuse am gleichen Versuchstag genau so niedrig wie der der behandelten infizierten Mäuse war (s. Abb.8, am 31.Tag p.i.). Am 34. Tag nach der Behandlung zeigte die behandelte infizierte Maus mit nachweisbaren Trypanosomen einen niedrigeren Wert als die behandelte infizierte Maus ohne Trypanosomen. Die Auswertung war wegen der wenigen Probezahlen schwierig.

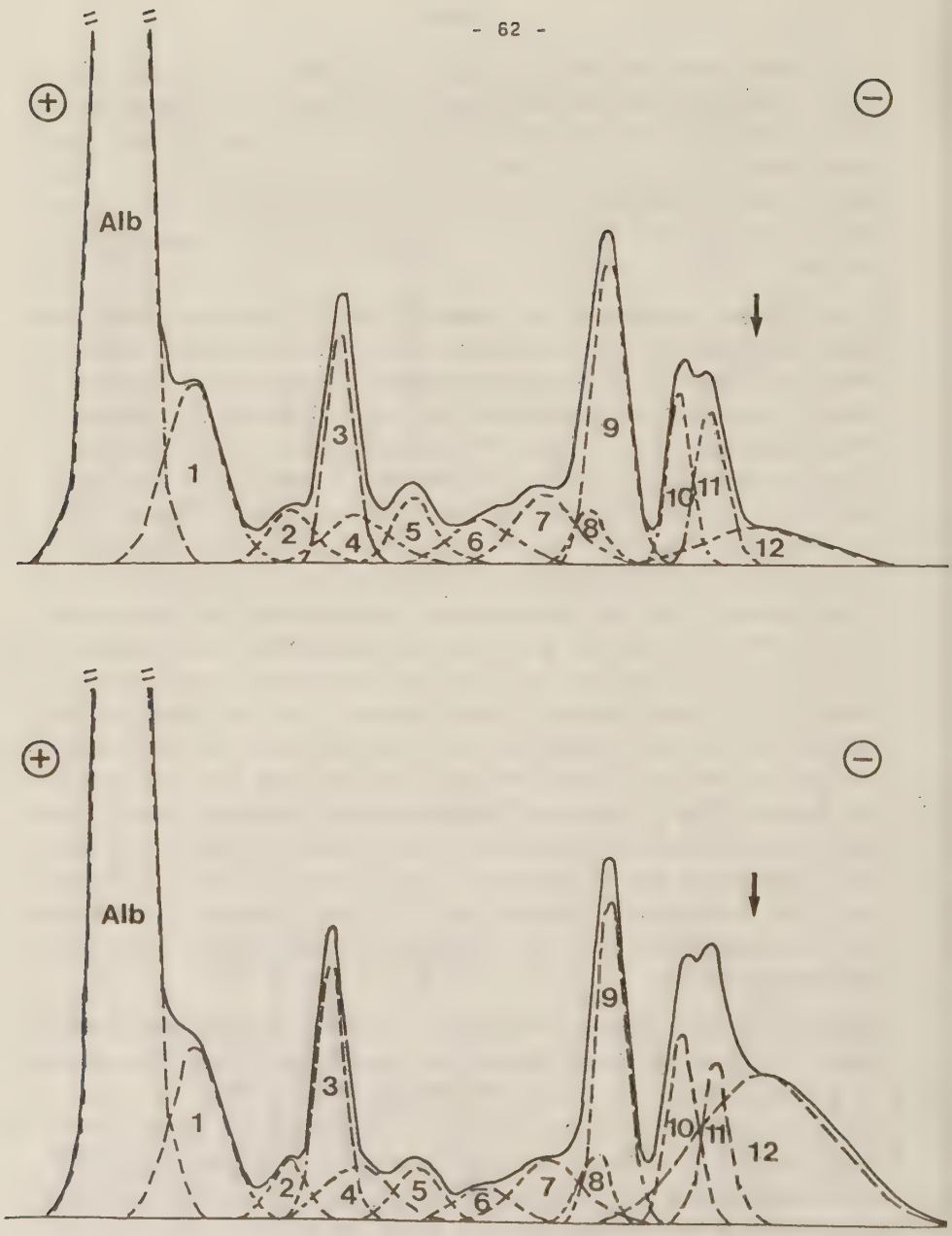


Abb.20: Pherogramme der Plasmaproteine einer mit Berenil behandelten Kontroll-(oben) und infizierten Maus (unten).
↓: Auftragungsstelle, ——: ausgewertete Pherogramme,
----: mit Analogrechner ausgewertete Fraktionen

Fr. Nr.	A (cm)	Kontr. (g/l)	Kontr.+ Berenil (g/l)	Inf.+ Berenil (g/l)
Alb.	4.91	32.7±9.49	28.6±4.03	29.6±6.89
1	4.05	2.98±0.77	2.98±0.82	2.49±0.26
2	3.59	0.60±0.16	0.41±0.20	0.66±0.34
3	3.16	2.18±0.70	1.20±0.24	1.46±0.30
4	2.96	0.07±0.02	0.76±0.15***	0.89±0.22***
5	2.65	0.81±0.37	0.61±0.16	0.79±0.40
6	2.10	0.51±0.03	0.49±0.11	0.50±0.19
7	1.59	0.80±0.36	0.60±0.14	0.80±0.30
8	1.36	0.55±0.18	0.56±0.35	0.64±0.35
9	1.17	2.70±0.83	2.62±0.67	3.17±0.66
10	0.66	0.97±0.32	0.95±0.04	1.16±0.35
11	0.43	1.24±0.54	1.24±0.52	0.94±0.16
12	-0.12	0.63±0.29	1.15±0.25	4.33±1.79**

Tab.7: Quantifizierung der einzelnen Plasmaproteinfraktionen nach Berenil-Behandlung
A: Abstand von Auftragungsstelle (cm), *: s. Tab.4

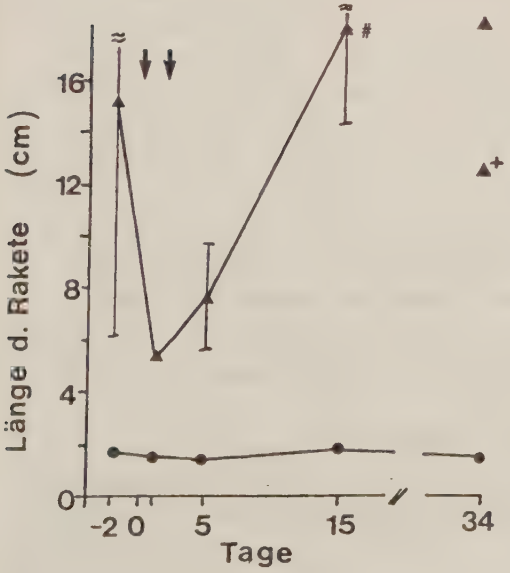
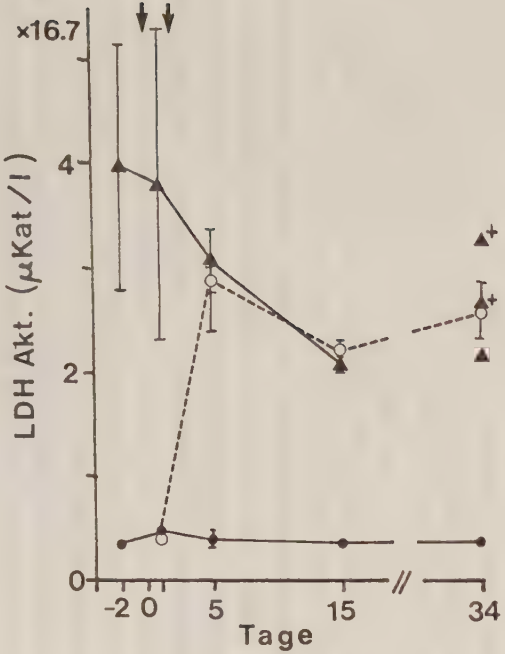
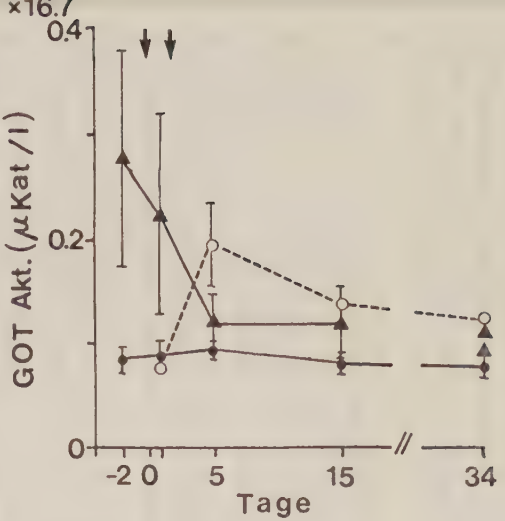


Abb.21: IgM-Veränderung nach Berenil-Behandlung
●--●: Kontrolltiere,
▲--▲: infizierte Tiere + Berenil,
⬇: Berenilgabe,
+: Tryp. im Blut,
#: Mittelwert errechnet sich aus 2 behandelten infizierten Mäusen

Die erhöhten LDH-, GOT-, GPT- Aktivitäten der infizierten Mäuse nahmen durch die erste; niedrige Berenilgabe zwar schwach ab, aber 2 von 4 behandelten Mäusen hatten immer noch Parasiten im Blut, so daß die individuellen Schwankungen der Werte zwischen 2 behandelten infizierten Gruppen (ohne Trypanosomen und mit Trypanosomen) sehr groß waren . Durch die zweite, höhere Berenilbehandlung wurden die LDH-, GOT-, GPT-Aktivitäten weiter herabgedrückt (Abb.22). Auffallend ist, daß die LDH-, GOT-Aktivitäten der mit Berenil behandelten Kontrolltiere bereits am 3.Tag nach der zweiten höheren Berenilgabe (35mg/kg) stark anstiegen. Die erste Berenilgabe (7mg/kg) hatte keinen Einfluß auf die Enzymaktivitäten der Kontroll-Maus, die zweite höhere Berenilgabe jedoch steigerte am 3.Tag nach der Behandlung die LDH-Aktivität auf das 8 fache, die GOT-Aktivität auf das 2 fache. Die GPT-Aktivität nahm am 3.Tag nach der 2. Behandlug nur um 20% zu. Die durch Berenil erhöhte LDH-Aktivität blieb trotz der Schwankung immer viel höher als die der Kontrollen. Die GOT-Aktivität der behandelten Kontrollen sank danach mit der Zeit langsam ab, aber war 34 Tage nach der Berenilgabe auch immer noch höher (ca.60%) als die der Kontrollen. Die GPT-Aktivität der behandelten Kontrollen zeigte am 15.Tag nach der Behandlung den höchsten Wert (ca.2 fach) und sank am 34.Tag auf den der Kontroll-Aktivität ab. Am 15.Tag nach der Gabe, an dem keine Trypanosomen bei den behandelten infizierten Mäusen nachzuweisen waren, stimmten die LDH-, GOT- und GPT-Aktivitäten der mit Berenil behandelten infizierten Mäuse beinah mit denen der behandelten Kontrollen überein. Mit dem Wiederauftreten der Trypanosomen am 34.Tag nach der Gabe stieg die LDH-Aktivität einer behandelten infizierten Maus wieder um ca. 30% gegenüber den mit Berenil behandelten Kontrollen an, aber die GOT- und GPT-Aktivitäten blieben im Bereich der behandelten Kontrollen, Kein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Wiedererscheinen der Trypanosomen und dem Enzymaktivitätsanstieg konnte beobachtet werden. Aber bei der LDH ist es denkbar, daß wegen der durch Berenil allein erhöhten Aktivität in den behandelten Kontrollen der Zusammenhang verschleiert wird.

Die durch die Berenilgabe auftretenden Veränderungen der LDH-Aktivität wurden mit Hilfe der Elektrophorese aus der Analyse der Isoenzyme ermittelt. Die LDH-Isoenzymverteilung ist in Tab.8 angegeben.





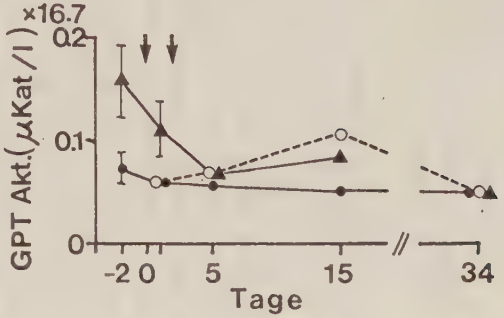


Abb.22: Plasmaenzymaktivitätsverlauf von LDH, GOT, GPT nach Berenil-Behandlung
●——●: Kontrolltiere, O---O: Kontrolltiere + Berenil, ▲——▲: infizierte Tiere + Berenil, ⬇: Berenilgabe, +: Trypanosomen im Blut

		Kontr.	Kontr.+ Berenil	Inf.+ Berenil(-)	Inf. Berenil(+)
LDH_1	(a)	1,09±0,401	2,76±0,818	1,95±0,234	2,05
	%	18,7±3,46	5,9±0,07	5,2±1,36	3,7
LDH_2	(a)	0,87±0,334	3,32±0,134	2,96±0,384	3,49
	%	16,5±4,81	7,6±0,51	7,6±1,77	6,3
LDH_3	(a)	1,92±0,301	5,95±0,078	5,69±2,305	11,69
	%	33,9±1,34	14,3±4,60	14,4±6,62	20,9
LDH_4	(a)	0,57±0,033	3,82±1,319	3,39±0,097	2,87
	%	10,3±2,69	10,0±2,83	8,8±1,32	5,2
LDH_5	(a)	1,14±0,002	27,91±9,252	25,13±7,031	35,45
	%	20,4±4,17	62,1±3,46	63,7±7,53	63,9

Tab.8: Absolute und prozentuale Aktivität der LDH-Isoenzyme im Mausplasma nach Berenil-Behandlung
(a): Absolute Werte (µKat/l/Fläche), (-): keine Trypanosomen
(+): Trypanosomen im Blut

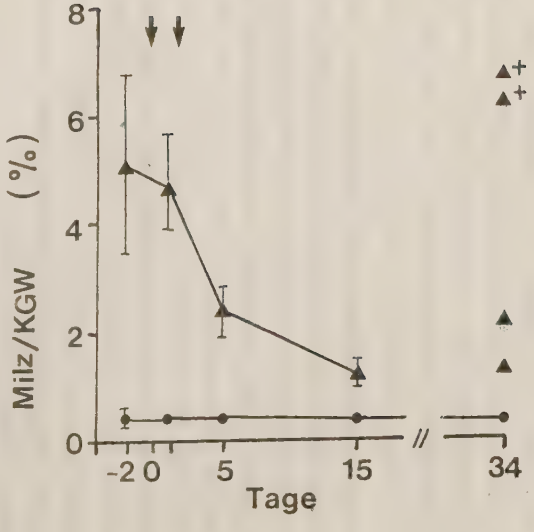
Eine Zunahme der LDH-Aktivität bei den behandelten Kontrollen trat in allen Isoenzymen, aber in unterschiedlichem Maße auf. Die LDH_1, LDH_4 und LDH_5 der Kontroll-Mäuse stiegen durch Berenil genau so stark wie die der infizierten Mäuse an (LDH_1-2,5 fach, LDH_4-ca.7 fach, LDH_5-25 fach, sieh Tab.5). Der Unterschied des LDH-Aktivitätsanstiegs zwischen den behandelten Kontroll- und den infizierten Mäusen war nur bei LDH_2 und LDH_3 festzustellen. Zwar nahmen sowohl LDH_2 als auch LDH_3 der behandelten Kontrolltiere auf das 3-4 fache gegenüber den Kontrollen zu, aber ihre Aktivitäten lagen ungefähr bei der Hälfte der LDH_2- bzw. LDH_3-Aktivitäten bei den unbehandelten infizierten Mäusen.
Sowohl die absoluten als auch die prozentualen Werte jeder Isoenzymaktivität bei den mit Berenil behandelten infizierten Mäusen stimmten mit denen bei den behandelten Kontrollen überein, solange keine Trypanosomen im Blut bei den behandelten infizierten Mäusen nachweisbar waren. Daraus wird der Schluß gezogen, daß Berenil nur die durch T.congolense-Infektion zunehmenden LDH und LDH_3-Aktivitäten senken kann, aber gleichzeitig auch alle LDH-Isoenzym-

Aktivitäten der Kontrollen in unterschiedlichm Maße erhöht. Auffallend ist, daß mit dem Wiederauftreten der Trypanosomen sofort nur LDH_3, aber nicht LDH_2, wieder um das 6-fache auf den Wert der infizierten Mäusen anstieg.

Wie die bis hier beschriebenen anderen Parameter ließen sich die Milz- und Leber-Vergrößerungen nach der ersten Berenilgabe mäßig, nach der zweiten höheren Berenilbehandlung stark rückgängig machen (Abb.23). Berenil allein hatte keinen Einfluß auf das Gewebsgewicht. Das Milzgewicht der behandelten infizierten Mäuse bezogen auf das Körpergewicht, nahm am 3.Tag nach der zweiten Berenilgabe vom 10 fachen auf das 5 fache ab und war am 15.Tag nur 2,8 mal größer als das der Kontrollen. Das Lebergewicht nahm ebenfalls ab, wenn auch nicht im selben Maße. Die Milz- bzw. Leber-Gewichte am 15.Tag nach der Gabe lagen unter denen der infizierten Mäuse am 7.Tag p.i.. Mit Wiederauftreten der Parasiten jedoch begann die Vergrößerung der beiden Gewebe erneut. Am 34. Tag nach der Behandlung war das Milzgewicht der behandelten infizierten Mäuse mit Trypanosomen wieder durchschnittlich auf das 13 fache, ihr Lebergewicht auf das 2 fache angewachsen, das Milzgewicht der behandelten infizierten Mäuse ohne Trypanosomen nur auf das 3,5 fache, ihr Lebergewicht auf das 1,2 fache gegenüber den behandelten Kontrollen. Bei den Milz- und Leber-Gewichten war die Korrelation zwischen dem Wiedererscheinen der Trypanaosomen und dem wieder auftretenden Rückfall klar festzustellen, obwohl andere Parameter -wie oben diskutiert- eine weniger deutliche Tendenz zeigten, sich wieder auf die Werte der unbehandelten infizierten Tiere einzupendeln.

Obwohl die mit Berenil behandelten Kontrolltiere bei dem Gewebsgewicht keine Veränderung gegenüber den Kontrollen zeigten, wurden dennoch einige Unterschiede bei den histochemischen Anfärbungen an Milz bzw. Leber zwischen den behandelten und unbehandelten Kontrollmäusen festgestellt.

Die Behandlung von Mäusen mit Berenil führte zu einer deutlichen Zunahme von Zahl und Aktivität saure Phosphatase positiver Granula in den Leberzellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Dagegen blieben sowohl die Größe der Leberzellen als auch der v. Kupfferschen Zellen sowie die Zahl der saure Phosphatase positiven v. Kupfferschen Zellen unverändert.



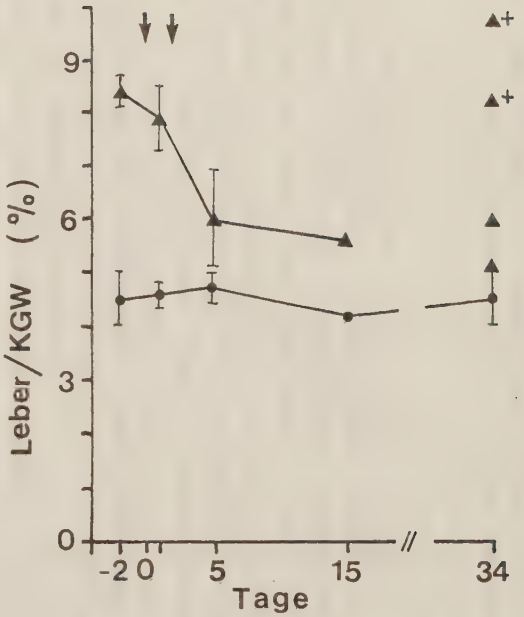


Abb.23: Milz-, Lebergewichtsveränderungen nach Berenil-Behandlung
●——●: Kontrolltiere, ▲——▲: infizierte Tiere + Berenil, ↓: Berenilgabe,
+: Trypanosomen im Blut

Auffällig war, daß bei behandelten infizierten Mäusen in den Hepatozyten die Zahl und Aktivität saure Phosphatase-positiver Granula niedriger lag als bei behandelten Kontrollen, andererseits aber etwas höher als bei unbehandelten Kontrollen. Die Vergrößerung und die Vermehrung der v. Kupfferschen Zellen waren bei den behandelten infizierten Mäusen deutlicher im Vergleich zu den unbehandelten und behandelten Kontrolltieren. Jedoch waren die Größe und die Zahl der v. Kupfferschen Zellen nicht so stark verändert wie bei den nichtbehandelten infizierten Mäusen 31.Tag p.i.. Herdförmige Ansammelungen saure Phosphatase positiver Zellen konnten wie bei den nichtbehandelten infizierten Mäusen nachgewiesen werden.

Die mit Berenil behandelten Kontrolltiere zeigten in den Hepatozyten wie bei der sauren Phosphatase-Aktivität eine höhere β-Glucuronidase-Aktivität als die unbehandelten Kontrollen. Die Veränderung betraf die periportalen Felder stärker als das zentrolobuläre Gebiet. Dagegen war die β-Glucuronidase-Aktivität bei den behandelten infizierten Mäusen in den Hepatozyten geringer als bei den behandelten Kontrollen. Außerdem ließen die mit Berenil behandelten infizierten Mäuse wenigere β-Glucuronidase positive Granula in den Hepatozyten erkennen als saure Phosphatase positive Partikel, obwohl die Schnitte für die beiden Aktivitäten aus einer Maus stammten(Abb.24-1,2).

Die weiße Milzpulpa zeigte bei behandelten Kontroll- und behandelten infizierten Mäusen keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der sauren Phosphatase-Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. In der roten Milzpulpa waren zwischen unbehandelten und behandelten Kontrollen keine wesentlichen Differenzen nachweisbar. Bei den behandelten infizierten Mäusen konnten die Veränderungen der Größe und der Zahl von Makrophagen deutlich beobachtet werden. Das Cytoplasma war mit saure Phosphatase positiven Granula angefüllt. Im Vergleich zu den unbehandelten infizierten Mäusen waren diese Veränderungen jedoch viel schwächer.

Wie beim Nachweis der sauren Phosphatase-Aktivität traten auch hinsichtlich der β-Glucuronidase-Aktivität zwischen behandelten Kontroll- und behandelten infizierten Mäusen keine deutlichen Unterschiede in der weißen Milzpulpa auf. Merkwürdigerweise nahm die β-Glucuronidase-Aktivität in den Zellen der roten Pulpa bei den behandelten Kontrollen stärker zu als bei den behandelten infizierten Mäusen, obwohl kein Anstieg der sauren Phosphatase-

Aktivität in der roten Pulpa bei den behandelten Kontrollen festzustellen war. Leider konnten die Veränderungen an den Milzen der behandelten infizierten Mäuse mit denen der infizierten Mäuse ohne Behandlung aus den eingangs erwähnten Gründen nicht verglichen werden(Abb.25-1,2).

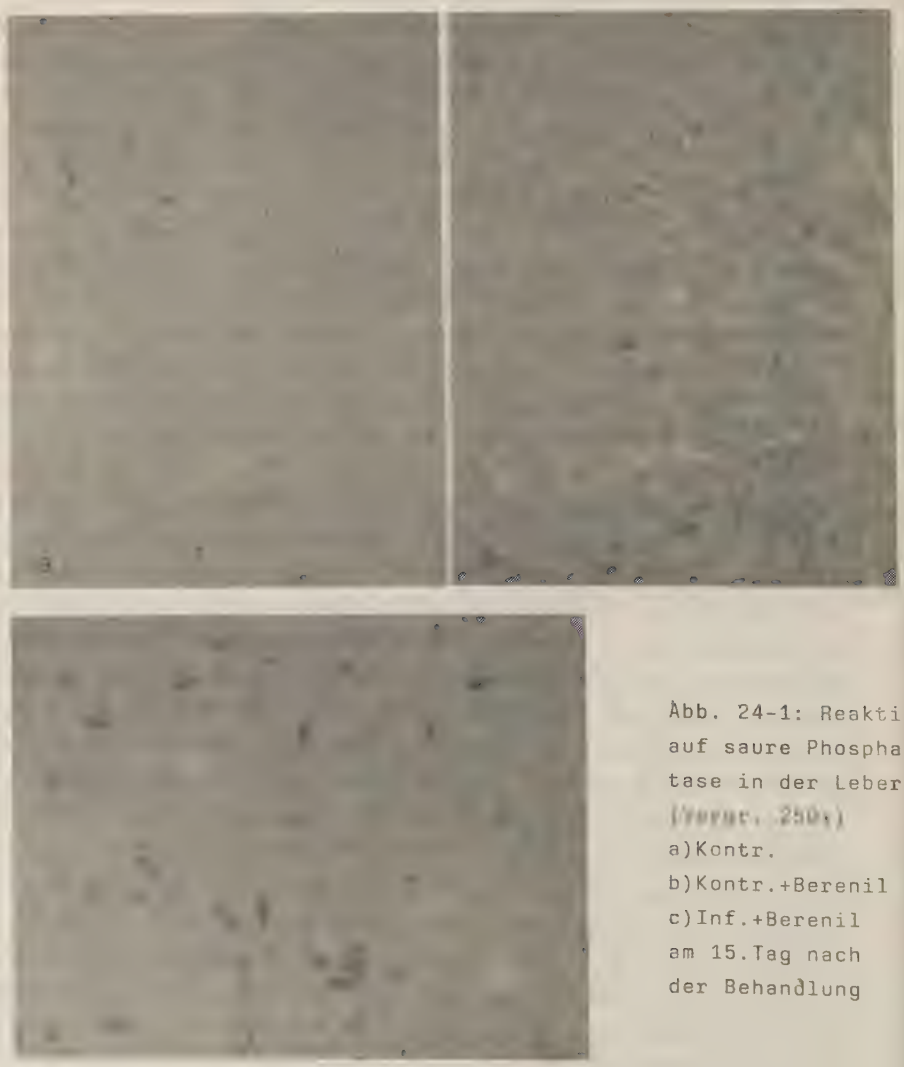


Abb. 24-1: Reaktion auf saure Phosphatase in der Leber (Vergr. 250x)
a)Kontr.
b)Kontr.+Berenil
c)Inf.+Berenil
am 15.Tag nach der Behandlung

Abb.24-2: Reaktion auf β Glucuronidase in der Leber (Vergr. 250x)
a) Kontrolle, b) Kontrolle+Berenil. c) infizierte Maus, am 15Tag nach der Behandlung

Abb.25-1: Reaktion auf saure Phosphatase in der Milz (Vergr. 100x)
a) Kontrolle, b) Kontrolle+Berenil, c) infizierte Maus+Berenil, am 15.Tag nach der Behandlung

a b c

Abb.25-2: Reaktion auf β-Glucuronidase in der Milz (Vergr. 100x)
a) Kontrolle, b) Kontrolle+Berenil, c) infizierte Maus+Berenil, am 15.Tag nach der Behandlung

b) Berenil-Behandlung nach kurzer Infektionsdauer

Vom 1.Tag nach der Berenilgabe bis zum 5.Monaten konnte kein einziges Trypanosom im Blut gefunden werden. Weitere Untersuchungen wurden daher nicht ausgeführt.

3.2. Akute T.congolense Infekiton an Mäusen (Stamm: T.C. 423)

Bei akut infizierten Tieren wurden entsprechende Versuche wie bei den chronisch infizierten Tieren durchgeführt.

a) Parasitämie- und Enzymaktivitätsverlauf während der akuten Infektion

Im peripheren Blut wurde am 1.Tag nach der Impfung nur bei 2 von 5 Mäusen eine Parasitämie von mehr als 10^6 Tryp./ml nachgewiesen, am 2.Tag bereits bei allen Mäusen (Abb.26). Sie stieg schnell weiter an und erreichte bei allen 5 Mäusen 84 Stunden nach der Infektion über $1x10^8$ Tryp./ml Blut. Zwischen 72 Stunden P.i. und 84 Stunden p.i. sind 40%, zwischen 84 Stunden und 96 Stunden p.i. 60% der Mäuse gestorben. Die Parasitämie der akuten Infektion zeigte einen einmaligen dramatischen Anstieg bis zum Tod der Tiere im Gegensatz zu dem typischen Auf und Ab der zuvor beschriebenen chronischen Infektion.

Während der akuten Infektion wurden LDH-, GOT-, Alp- und saure Phosphatase-Aktivitäten bestimmt, ihre Verläufe sind aus Abb.27-a, b ersichtlich. Hierbei muß allerdings berücksichtigt werden, daß die Werte der Enzymaktivitäten bei den Kontrollen wegen der unterschiedlichen Blutabnahmemethode (bei der akuten Infektion: Dekapitation) höher als die bei den entsprechenden Bestimmungen während der chronischen Infektion lagen. Trotzdem waren einige deutlichen Enzymaktivitätsveränderungen der infizierten Mäuse gegenüber den Kontrollen nachzuweisen.

Die Aktivität von LDH und GOT bieb bei den infizierten Mäusen in den ersten Tagen unverändert, stieg aber danach besonders von 84.Stunden p.i. an (kurz vor dem Exitus) auf das Doppelte der Kontroll-Mäuse an. Der Verlauf der Aktivitäten von Alp und saurer Phosphatase wies während der akuten Infektion bei keiner Maus wesentliche Veränderungen auf.

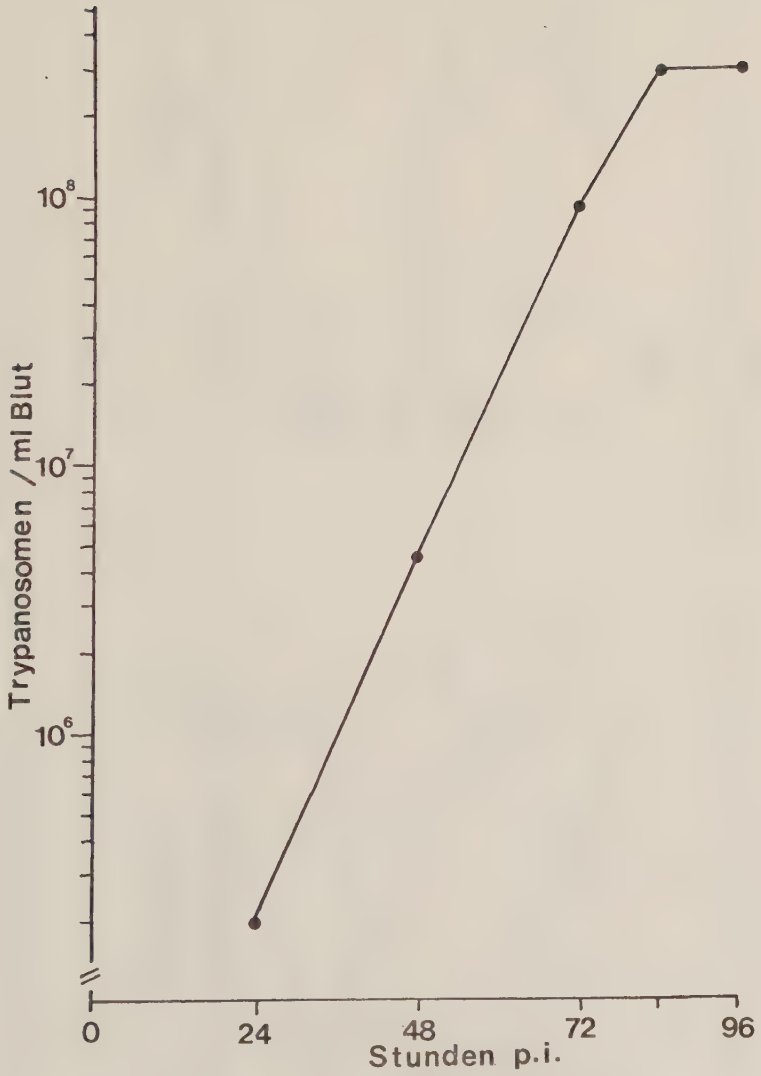
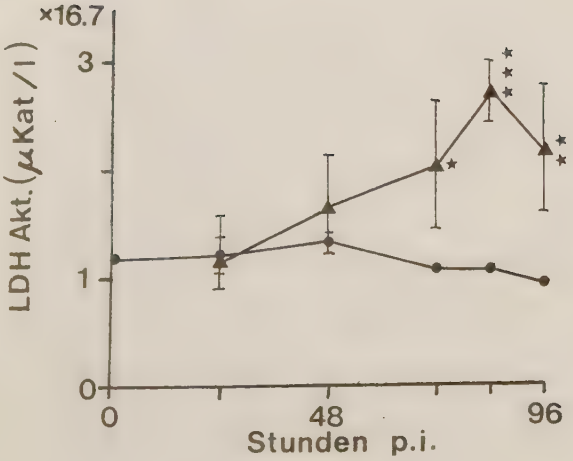


Abb.26: Parasitämieverlauf während der akuten Infektion an Mäusen



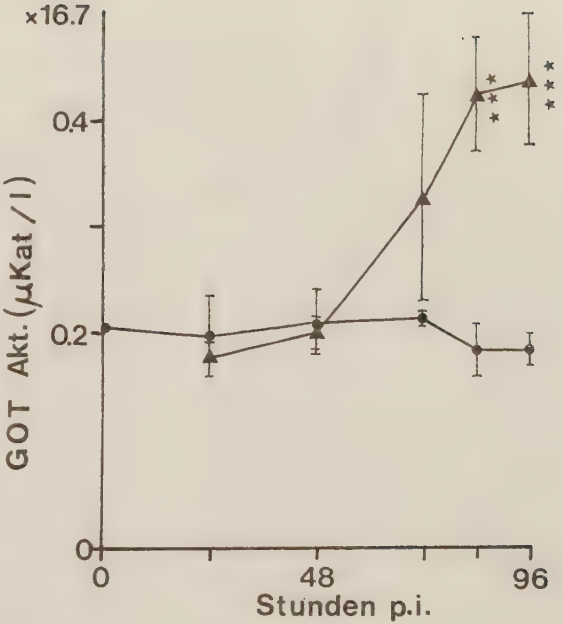
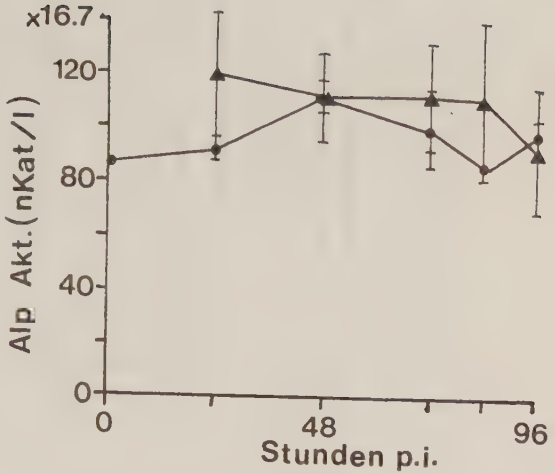


Abb.27-a: Serumaktivitätsverlauf von LDH, GOT während der akuten Infektion an Mäusen
●——●: Kontrolltiere, ▲——▲: infizierte Tiere, *: s. Abb.4



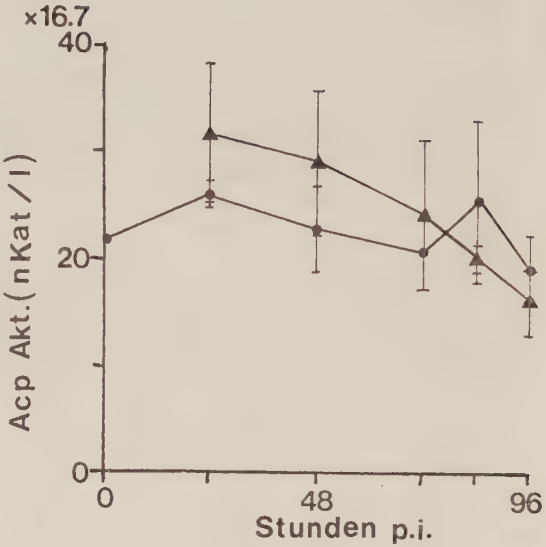


Abb.27-b: Serumaktivitätsverlauf von Alp, Acp während der akuten Infektion an Mäusen
●—●: Kontrolltiere, ▲—▲: infizierte Tiere,

	Kontr.	Inf.
Hämoglobin(g/l)	0,163±0,009	0,155±0,010
Hämatokrit(%)	59,4±3,18	49,4±1,67**
LDH(µKat/l)	4,11±0,35	35,12±4,94***
GOT(µKat/l)	1,29±0,16	4,47±0,98***
GPT(µKat/l)	1,01±0,06	1,84±0,21***
Alp(µKat/l)	0,59±0,08	1,04±0,07**
Harnstoff(mmol/l)	8,05±2,05	6,17±1,47
Glukose(mmol/l)	6,31±1,18	6,06±1,92
Protein(g/l)	46,1±2,04	50,8±2,14
Milz/KGW(%)	0,57±0,09	0,73±0,10***
Leber/KGW(%)	5,04±0,42	5,28±0,42
Nieren/KGW(%)	1,25±0,09	1,21±0,10

Tab.9: Hämatologische, biochemische und Gewebsgewichtsveränderungen am 3.Tag der akuten Infektion an Mäusen
*: s. Tab.4

b) Hämatologische-, biochemische- und Gewebsgewichts-Veränderungen am 3.Tag der akuten Infektion

Aus den Untersuchungen für den Parasitämie- und Enzymaktivitäts-Verlauf während der akuten Infektion ergab sich, daß sowohl die Parasitämie als auch LDH- und GOT-Aktivitäten mit der Infektionszeit anstiegen, jedoch erst bei Trypanosomenzahlen von > $1x10^8$/ml, d.h. ca. 1 Tag vor dem Exitus. Die Bestimmungen der übrigen Parameter wurden wie bei der chronischen Infektion ebenfalls am 3.Tag nach der Infektion durchgeführt. Am 3.Tag p.i. erreichte die Parasitämie der akut infizierten Mäuse bereits einen sehr hohen Mittelwert von $2x10^8$ Tryp./ml. Die Mittelwerte der hier durchgeführten Bestimmungen werden in Tab.9 aufgeführt.

Bei der akuten Infektion fiel nur der Hämatokritwert aber nicht der Hämoglobingehalt ab, während beide Parameter bei der chronischen Infektion am 3.Tag p.i. einen signifikanten Abfall zeigten.

Alle hier gemessenen Enzymaktivitäten zeigten einen stärkeren Unterschied zwischen den Kontrollen und den infizierten Mäusen als die bei der Untersuchung-3.2.a.. Dieser Unterschied ist sehr wahrscheinlich auf die Blutabnahmemethode zurückzuführen.

Die LDH-Aktivität nahm auf das 8-fache, GOT-Aktivität auf das 3-fache zu. Diese Erhöhung der Aktivität von LDH und GOT war etwas höher als die der chronischen infizierten Mäuse am 3.Tag p.i.. Auffallend ist, daß die Alp-Aktivität bei den akut infizierten Mäusen um 70% zunahm, obwohl kein Anstieg der Alp-Aktivität sowohl bei der Untersuchung der akuten Infektion (3.1.a) als auch bei der chronischen Infektion festzustellen war. Die Alp und GOT-Aktivitäten stiegen in ähnlichem Maße an.

Wie am 3.Tag nach der chronischen Infektion war auch das Milzgewicht mit signifikantem Unterschied, aber mäßiger, angewachsen. Weder das Lebergewicht noch Nierengewicht der infizierten Mäuse zeigte eine Veränderung.

Die anderen Parameter (Harnstoff, Glukose und Gesamtprotein), die der chronisch infizierten Mäusen am 3.Tag nach der Infektion keinen Unterschied gegenüber den Kontrollen zeigten, blieben auch bei den mit akuten T.congolense infizierten Mäusen unverändert.

c) Isoenzyme von LDH

LDH-Isoenzyme wurden genau wie bei der chronischen Infektion analysiert. Die absoluten und prozentualen Mittelwerte jedes LDH-Isoenzyms sind in Tab.10 angegeben. Anders als bei den mit chronischen T.congolense infizierten Mäusen zeigte die prozentuale Verteilung der LDH-Isoenzyme bei den mit akuten T.congolense infizierten Mäusen keine großen Unterschiede gegenüber den Kontrollmäusen. Zwar war die Zunahme der absoluten Aktivität von LDH_4 und LDH_5 ein bißchen stärker als die der anderen, aber diese Tendenz war nicht so deutlich wie die bei der chronischen Infektion, wenn man ihre Schwankung einrechnet. Deswegen ist es schwer, festzustellen, auf welche spezifische Gewebeschädigung diese Zunahme der LDH-Aktivität im infizierten Serum zurückzuführen ist.

	Absolute Werte (Akt./Fläche)			Prozentuale Werte(%)	
	Kontr.	Inf.	I/K	Kontr.	Inf.
LDH_1	1,34±0,251	2,47±0,501	1,85	7,2±1,39	7,1±1,46
LDH_2	3,51±0,284	6,11±0,544	1,75	18,9±1,55	17,6±1,57
LDH_3	7,11±2,194	12,28±1,800	1,72	38,4±11,4	35,3±5,18
LDH_4	1,42±0,595	3,87±0,785	2,78	7,5±3,12	11,1±2,29
LDH_5	3,86±1,344	10,99±1,546	2,59	20,6±7,25	28,8±4,45

Tab.10: Absolute und prozentuale Verteilung der LDH-Isoenzyme im Mausplasma aus Kontroll- und akut infizierten Tieren
Akt.: µKat/l

4. Diskussion

Die primäre Ursache für die pathogene Wirkung von T.congolense ist noch nicht aufgeklärt, obwohl bereits zahlreiche Untersuchungen dazu durchgeführt wurden. In den meisten Versuchen wurden Kälber und Rinder als Versuchstiere eingesetzt, was vernünftig ist, da sie die natürlichen Wirte der Parasiten darstellen. Betrachtet man die erzielten Ergebnisse, so zeigen sich jedoch viele Widersprüche. Die Gründe dafür liegen unter anderem daran, daß in den meisten Fällen die Tierpopulationen genetisch nicht einheitlich waren oder die Ergebnisse wegen zu geringer Anzahl von Tieren nicht statistisch ausgewertet werden konnten.

Diese Schwierigkeiten sind vermeidbar, wenn Labornager als Versuchstiere verwendet werden. Allerdings ergibt sich dabei das Problem, daß in Ratten bzw. Mäusen T.congolense Infektionen meistens akut verlaufen (Ratten: Simaren et al., 1970, 1973; Mäuse: Whitelaw et al., 1980), wogegen die natürliche Infektion bei Großtieren entweder subakut oder chronisch ist. Vereinzelt existieren jedoch T.congolense Stämme, die, ähnlich der Infektion in Rindern und Kälbern, auch in Mäusen eine chronische Infektion verursachen. Mit diesen T.congolense-Stämmen lassen sich natürliche Infektionen auf Labornagern simulieren. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit ermittelt werden,

a) inwieweit die verschiedenen klinischen und pathologischen Befunde bei der Rinder-Trypanosomiasis auch in diesem Mäuse-Modell sich bestätigen lassen,
b) Wie sich die Applikation von Berenil, dem in der Praxis überwiegend eingesetzten Trypanozid, auf den Verlauf der chronischen Infektion innerhalb der Mäuse auswirkt,
c) Welche unterschiedlichen pathogenen Ereignisse im Verlauf der akuten bzw. chronischen Infektion nachweisbar sind.

4.1. Chronische Infektion

Infektionsverlauf

Ähnlich wie auch bei vielen Infektionen in Großtieren (Wellde et al., 1974; Kobayashi et al., 1976b; Mackenzie et al., 1978) war in den Mäusen eine wellenförmige Parasitämie zu beobachten, mit einem zeitlichen Abstand von 5-11 Tagen zwischen den Parasitämie-

gipfeln.

Allerdings zeigte sich, daß von ursprünglich 110 infizierten Mäusen bereits nach dem 9. und 12.Tag p.i. ca. 30% der Mäuse starben. Dieser Zeitpunkt entspricht ziemlich genau dem 2. Parasitämiegipfel. In weiterem Verlauf der Infektion starben gelegentlich einzelne Mäuse; viele infizierte Mäuse blieben jedoch über einen Zeitraum von ca. 4 Monaten am Leben. Danach wurde die Beobachtung abgebrochen. Offensichtlich kann sich eine chronische Infektion aufbauen, wenn die Mäuse die zweite Parasitämiewelle erfolgreich überwinden können.

Ein zweiphasiger Parasitämieverlauf, in dessen späterer Phase Parasiten im Blut kaum oder zumindest zeitweise nicht mehr nachweisbar und die hämatologischen Werte nicht so niedrig wie in der initialen Phase waren (Dargie et al., (1979)-bei Rindern; Whitelaw et al., (1980)-bei Mäusen), ließ sich hier bis zum Ende des Untersuchungszeitraums nicht bestätigen. Eventuell war der zur Verfügung stehende Untersuchungszeitraum von ca. 6 Wochen hierfür zu kurz. Bei einzelnen Mäusen, die außerhalb des Hauptversuches bis zu 4 Monaten gehalten wurden, war in ca. 50% der Fälle keine Parasitämie mehr nachweisbar.

Hämatologische Befunde

Als hämatologisch auffallendster Befund der T.congolense Infektion (wie auch anderer Trypanosomen Infektionen) gilt die Anämie, die bereits am 3.Tag p.i. im Abfall des Hämatokrits, der Erythrozytenzahl, des Hämoglobingehalts sowie einer Zunahme der osmotischen Fragilität der Erythrozyten in unseren infizierten Mäusen sichtbar wurde.

Die Ursachen der generell bei Trypanosomen-Infektionen beobachteten Anämie wurden von verschiedenen Gruppen intensiv untersucht. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden dafür drei verschiedene Mechanismen diskutiert.

Bei den wenigen Untersuchungen an T.congolense infizierten Mäusen stellten Whitelaw et al. (1980) eine Zunahme des Blut- und Plasmavolumens fest. Vorübergehende Volumenzunahme normalisierte sich wieder zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion.

Hämolyse in Gegenwart von mikrobiellen Erregern läßt sich in vielen Fällen auf folgenden Mechanismus zurückführen: Von den Erre-

gern ans Blut abgegebene Antigene adsorbieren an Erythrozytenoberflächen. Antigen-spezifische Immunglobuline lagern sich an, in Gegenwart von Komplement tritt anschließend eine "passive" Hämolyse ein. Trotz einer erhöhten Erythrozytenzerstörung konnten Ikede et al. (1977) jedoch weder Hämolysine im infizierten Mäuseplasma noch Antikörper auf Erythrozyten nachweisen. Hämolyse wird jedoch von den meisten Gruppen als Hauptursache der Anämie angesehen (Kobayashi und Tizard, 1976a; Kobayashi et al., 1976b; Mackenzie et al., 1978; Nielsen et al., 1978 ; Banks, 1980; Tabel et al., 1980). Aus sterbenden Trypanosomen freigesetzte toxische Substanzen (freie Fettsäuren, Phospholipase A) sollen den Effekt vermitteln (Tizard et al., 1977). Allerdings wurden diese Versuche meistens in vitro durchgeführt mit Substanzmengen, von denen zweifelhaft ist, ob sie in ähnlicher Konzentration auch in vivo auftreten. Die Versuche von Ikede et al. (1977) zur Hämolyse ließen sich auch in unserem Fall bestätigen, insofern, als bei der in vitro Inkubation der Erythrozyten mit Plasma aus infizierten Mäusen keine Zellzerstörung zu beobachten war.

Sehr viel wahrscheinlicher scheint ein Phagozytosemechanismus zu sein. Ojok (1983) stellte bei infizierten Mastomys natalensis fest, daß Erythrophagie bzw. Trypanophagie durch Granulo- und Monozyten im strömenden Blut in der frühen Phase der T.congolense-Infektion eine wichtige Rolle zukommt. Im Allgemeinen findet die Phagozytose der Erythrozyten und Trypanosomen in erster Linie in Leber und/oder Milz statt (Mackenzie und Crurckshank, 1973; Ikede et al.,1977; Valli et al., 1978b; Dargie et al., 1979a,b).

Sichtbarer Ausdruck dafür ist die starke Vergrößerung der beiden Organe, die auch in unserem Fall auffällig in Erscheinung trat. Das Milzgewicht stieg auf das 12-fache, das Lebergewicht auf das doppelte an. Histochemische Untersuchungen zeigten eine starke Zunahme der lysosomalen Enzyme bereits zu Zeitpunkten, wo noch keine Organvergrößerung (besonders der Leber) feststellbar war. Besonders deutlich ist die Erhöhung der sauren Phosphatase und β-Glucuronidase, während eine Veränderung der N-acetyl-β-D-Glucosaminidase wegen zu geringer Nachweisempfindlichkeit nicht festzustellen war. Die Vermehrung und die Aktivierung der Kupfferschen Stern-Zellen in der Leber bereits am 3.Tag p.i. bestätigen die Abnahme von Valli et al. (1978b), daß die durch T.congolense-Infek-

tion beeinträchtigten Erythrozyten hauptsächlich durch Kupffersche Zellen zerstört werden. Summarisch ist festzuhalten, daß, trotz gewisser Unterschiede, in beiden Organen die Aktivität und die Zahl phagozytierender Zellen zunimmt. Die Organvergrößerung ist in erster Linie auf diesen Effekt zurückzuführen. Unklar ist der Mechanismus der gesteigerten Erythrophagie. Auflagerung von löslichen Immunkomplexen, bestehend aus Trypanosomen-Antigen und Antikörper oder direkte Opsonierung der Erythrozyten mit Antikörper auf Grund von Antigen-Kreuzreaktionen sind die wahrscheinlichsten Ursachen (Kobayashi und Tizard, 1976a; Kobayashi et al., 1976b; Ikede et al., 1977; Mackenzie et al., 1978; Nielsen et al., 1978; Banks, 1980; Tabel et al., 1980).

Neben der Anämie waren deutliche Veränderungen im Differentialblutbild der Leukozyten zu beobachten. Da die Messung jedoch nicht wie die der Anämie über den gesamten Untersuchungszeitraum erfolgte, sondern nur in einem späten Infektionsstadium gemessen (ca. 4 Monate) wurde, lassen sich keine Aussagen über die primären Veränderungen und ihre Entwicklung machen. Bei den nach 4 Monaten beobachteten Verschiebungen im Differentialblutbild muß man die Fälle unterscheiden, bei denen Trypanosomen im peripheren Blut nachweisbar sind, und solchen, wo dies nicht mehr möglich ist. Im ersten Fall traten eine starke Lymphopenie (ca. 50% der Kontrolle) und eine bis zu 40-fache Zunahme der Monozyten auf. In beiden Fällen waren gewisse Variationen bei den Granulozyten zu beobachten, sie waren jedoch wesentlich geringer ausgeprägt als bei den Monozyten und Lymphozyten. Diese Befunde sind insofern einleuchtend, als eine gesteigerte Phagozytoseneigung einerseits und eine erhöhte Immunsuppression anderseits übliche Begleiterscheinungen von Trypanosoma-Infektion sind (Mansfield und Bagasra, 1978; Morrison und Murray, 1979). Das Ausmaß beider Effekte scheint mit der Parasitenzahl korreliert zu sein. Die Immunsuppression bei afrikanischen Trypanosomen ist nicht auf die spezifischen Trypanosomen Antigene ausgerichtet sondern betrifft die Immunantwort allgemein. Vermutlich kommt es durch die Hemmung der Suppressor Zell-Wirkung zu einer polyklonalen Lymphozytenstimulierung und damit zu einer Erschöpfung des Immunsystems. Damit steht im Einklang, daß man bei erhöhtem Immunglobulin-Spiegel geringe spezifische Antikörperkonzentrationen findet.

Die ausgeprägte Erhöhung der Gesamtleukozytenzahlen und der Monozytenzahlen wie bei unserer Infektion wurde bei Rinder- bzw. Kälber-Infektionen nicht ermittelt. Naylor (1971), Losos et al., (1973) sowie Wellde et al., (1974) stellten im Gegenteil einen Abfall der Leukozytenzahl im Verlauf der T.congolense-Infektion fest. Aber die bei unseren infizierten Mäusen auftretende Lymphopenie stimmt mit dem Befund in der frühen Phase der Infektion bei Rindern und Kälbern überein (Naylor, 1971; Losos et al., 1973; Forsberg et al., 1979; Maxie et al., 1979; Valli et al., 1979a; Valli und Mills, 1980), während die gleichzeitig von meisten Autoren beobachtete Neutropenie im unseren Fall nicht festzustellen war. Der Abfall der Thrombozytenanzahl, wie von Wellde et al. (1978), Forsberg et al. (1979) und Maxie et al. (1979) bei Rindern festgestellt wurde, und die Verlängerung der Gerinnungszeit waren bei den mit T.congolense ca. 4 Monate lang infizierten Mäusen nachzuweisen, aber genauere Untersuchungen über das Gerinnungssystem stehen noch aus.

Biochemische Befunde

Das Gesamtprotein im Plasma blieb über den Infektionszeitraum überwiegend konstant, wenn auch gewisse Schwankungen nicht zu übersehen sind. Dies steht in gewissem Widerspruch zu Literaturangaben (Wellde et al., 1974; Luckins, 1975; Tabel et al., 1980; Valli et al., 1980), die einen gegenüber den Kontrollen gleichbleibenden oder abfallenden Gesamtproteingehalt beschreiben. Die Gründe für diese unterschiedlichen Befunde sind gegenwärtig ungeklärt. Ob die Erhöhung der Proteinkonzentration durch Veränderungen einzelner Plasmaproteine oder durch z.B. eine Verringerung des Plasmavolumens bedingt ist, ließ sich aus dem Elektrophorese-Profil der Plasmaproteine ablesen.

Nach einer von Siegert und Siemes (1977) entwickelten, mittels eines Analogrechners durchgeführten, quantitativen Auswertung des Plasmaproteinprofils zeigte sich, daß im Plasma infizierter Tiere einzelne Proteinfraktionen deutlich erhöht sind. Am ausgeprägtesten war der Effekt bei der Fraktion 12 zu erkennen, signifikant ($P \leq 1\%$) erhöht waren auch die Fraktionen 4, 7, 8 und 9, während eine abnehmende Tendenz der Fraktion 11 festzustellen war. Auf Grund der mangelnden Standardisierung der Mäuseplasmaproteine läßt sich nicht eindeutig sagen, um welche einzelnen Proteine es sich dabei

handelt. In Analogie zur Auswertung von Jarofke et al. (1981) könnte es sich bei der Fraktion 9 um Transferrin handeln, bei der Fraktion 12 um γ-Globulin. Das würde in Übereinstimmung stehen mit der vermuteten polyklonalen Stimulierung von Lymphozyten während der Trypanosomen-Infektion. Die anderen siginifikant veränderten Plasmaproteine liegen teils in der α-Globulin, teils in der β-Globulin Fraktion, obwohl es in diesem Fall schwierig ist, die Grenze genau festzulegen. Die Veränderungen traten bereits am 3.Tag p.i. auf und blieben dann aber den gesamten Infektionszeitraum annähernd konstant. Dies stimmt damit überein, daß auch der Gesamtproteingehalt sich während der Infektion nicht veränderte. Der von manchen Autoren beschriebene Abfall des Albumins (Wellde et al., 1974; Tabel et al., 1980; Valli et al., 1980; Whitelaw et al., 1980) war nicht zu bestätigen.

Auf Grund der immunologischen Reaktion des Wirtstieres gegen die verschiedenen Trypanosomenvarianten ist ein Anstieg sowohl von IgM als auch IgG zu erwarten. Dieser läßt sich für die IgG Fraktion bereits aus dem Elektrophoreseprofil vermuten (Anstieg der Fr. 12). Der IgM-Gehalt des Plasmas wurde quantifiziert mit Hilfe der Raketen-Immun-Elektrophorese. Dabei zeigte sich, daß der IgM-Gehalt im Plasma infizierter Tiere immer wesentlich höher war als der der Kontrolltiere und auch sehr starken Schwankungen unterworfen war. Aus dem Vergleich der Zeitabhängigkeit des IgM-Verlaufs (Abb. 8) mit der des mittleren Parasitämieverlaufs (Abb.2) kann man den Eindruck gewinnen, daß der Anstieg des IgMs immer in Phasen eines Parasitämieabfalls erfolgt und umgekehrt (mit der Ausnahme um den Tag 27 p.i.). Darin könnte sich die Eliminierung einer bestimmten, gerade vorherrschenden Parasiten-Population durch IgM ausdrücken. Der nach dem Durchlaufen eines jeweiligen IgM-Gipfels wieder erfolgende relativ schnelle Abfall könnte auf die Zunahme des Immunglobulinkatabolismus zurückgeführt werden, der von Nielsen et al. (1978) bei T.congolense-Infektionen von Rindern beschrieben wurde.

Von besonderem Interesse war die Untersuchung von Gewebsenzymen im Plasma, da hier Hinweise zu erwarten waren auf pathologische Veränderungen im infizierten Tier.

Am auffallendsten war der bereits am 3.Tag p.i. erfolgte LDH-Anstieg auf das 7-fache, der sich im weiteren Infektionsverlauf kontinuierlich auf das 9-fache steigerte. Ebenso waren bereits am

3.Tag p.i. GOT- und GPT-Aktivitäten auf das Doppelte angestiegen, veränderten sich aber nur noch geringfügig in den folgenden Infektionsphasen. Bei der alkalischen Phosphatase ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren und infizierten Tieren nachweisen. Die Auswertung der LDH-Isoenzyme ergab einen besonders starken Anstieg in LDH_5, dem Leber und Skelettmuskel spezifischen Isoenzym. Aber auch die Aktivität in LDH_1, dem Herz spezifischen Isoenzym, stieg bei den infizierten Tieren auf das Doppelte, war aber im Vergleich zu dem LDH_5-Anstieg schwächer. Diese LDH_1-Erhöhung könnte damit zusammenhängen, daß das Herzgewicht um ca. 25% während der Infektion zunahm, wie auch Losos, Mwanbu (1979) sowie Maxie et al. (1979) bei der T.congolense-Infektion an Rindern feststellten.

Die Auswertung der GOT-Isoenzyme erwies sich als schwieriger, weil Plasma-GOT elektrophoretisch nicht genau übereinstimmt mit den aus einzelnen Geweben isolierten Enzymen. Mit Sicherheit läßt sich jedoch sagen, daß der GOT-Anstieg im Plasma nicht primär durch Freisetzung von trypanosomaler GOT aus abgetöteten Parasiten bedingt ist, wenn auch ein gewisser Prozentsatz der Plasma-GOT aus Trypanosomen stammt (Verschiebung im kathodischen Bereich der GOT-Isoenzyme im Plasma infizierter Mäuse, s. Abb.15).

Aus den Untersuchungen der Plasmaenzyme läßt sich der Schluß ziehen, daß eine Leber- und/oder Skelettmuskel-Schädigung, unter Umständen auch eine gewisse Herzmuskelschädigung besteht. Versuche, eine eventuelle Schädigung von Herzmuskelzellen klarer zu diagnostizieren durch die Bestimmung der Creatin Kinase-Aktivität (CK), waren nicht eindeutig auswertbar. Dies lag einmal daran, daß allein bedingt durch den Stress der Tiere bei der Blutabnahme die CK-Aktivität anstieg (ein auch sonst bereits bekanntes Phänomen, Schmidl,(1981)), zum andern daran, daß keine eindeutige Isoenzymcharakterisierung zur Unterscheidung von Skelett- und Herzmuskel bei Mäusen möglich war.

Leberschädigungen an Trypanosomen-infizierten Mäusen sind nicht nur aus den bereits beschriebenen Gewichtszunahmen (s. Abb.23) zu erwarten. Mehrfach werden auch histologisch größere nekrotische Bezirke in der Leber beschrieben (Morrison et al., 1982; Büngener, 1983). Außerdem wurde von Treadwell (1969) und Bradfield, Wells (1978) ermittelt, daß die Phagozytose durch Kupfferśche Zellen

lysosomale Enzyme freisetzt und sich in der Leber fokalen Zellnekrosen entwickeln.

Auf Grund der Leberschädigung hätte man an sich einen Abfall des Harnstoffs im Plasma zu erwarten. Man findet aber genau das Gegenteil, einen ab dem 10.Tag p.i. signifikant erhöhten Harnstoffwert. Dies ließe sich durch eine Beeinträchtigung der Nieren erklären, wenn trotz der verminderten Harnstoffbildung in der Leber wegen zu geringer Ausscheidung der Harnstoff-Plasmaspiegel erhöht wurde. In den verwendeten Mäusen konnten jedoch keine morphologischen und histologischen Veränderungen der Niere anolog zu denen an Milz und Leber gefunden werden. In der Literatur existieren nur schwache Hinweise auf Glomerulusveränderungen und grobe Zellinfiltrate um die Gefäße an der Grenze Nierenrinde / Nierenmark (Büngener, 1983). Zu diskutieren ist allerdings noch eine andere Ursache: In jüngster Zeit ist es gelungen, eine heterogene Verteilung von Leberparenchymzellen nachzuweisen. Danach gruppieren sich die Harnstoff-bildenden Hepatozyten um die von der Vena porta einmündenden Venen, sind jedoch in anderen Bereichen nicht nachzuweisen (Gebhardt u. Mecke, 1983,1984). Es wäre denkbar, daß die von Trypanosomen ausgehende Schädigung gerade diese Bereiche ausspart und damit den intakt gebliebenen Zellen ein relativ höheres Substratangebot für die Harnstoffsynthese zur Verfügung steht.

Serologische, histologische und hämatologische Befunde lassen sich nicht widerspruchsfrei zu einem einheitlichen Bild zusammenfassen. Das ist nicht unerwartet und findet seine Parallelen bei entsprechenden Untersuchungen an anderen Trypanosomen-Arten. Deutlich wird aber doch, daß mehrere pathogene Vorgänge den Verlauf einer chronischen T.congolense-Infektion bei der Maus prägen: Auf der einen Seite finden wir die ausgeprägte Hämolyse, die wohl auf eine gesteigerte Phagozytose von geschädigten Erythrozyten zurückzuführen ist, wobei die Art der Primärschädigung unklar ist (Opsonisierung?, toxische Schädigung durch trypanosomale Zerfallsprodukte?). Auf der anderen Seite sprechen die drastischen LDH- und GOT-Erhöhungen für nachhaltige Muskel- und Leberschäden. Leider war die Abklärung Skelett- versus Herzmuskel nicht möglich, da bei der Maus eine klare Charakterisierung der Kreatinphosphokinase Isoenzyme nicht funktioniert. Bei Rindern ist im Spätstadium der Erkrankung oft ein Herzmuskelschaden feststellbar.

Berenil-Behandlung

Berenil ist das gegenwärtig in der Praxis am häufigsten verwendete Chemotherapeutikum, weil es neben seiner starken trypanoziden Wirkung relativ selten Resistenz-Stämme produziert. Außerdem sind sowohl sein Wirkungsmechanismus als auch die Pharmakokinetik weitgehend geklärt (Newton, 1970, 1972: Klatt und Hajdu, 1976; Gilbert und Newton, 1982; Gilbert, 1983). Allerdings ist auch die Berenil-therapie mit Schwächen behaftet.

Selbst die Verdoppelung der vom Hersteller empfohlenen Berenil-Dosis von 3.5mg/kg Körpergewicht reichte nicht aus, um die Trypanosomen völlig aus dem Blut der infizierten Mäuse zu eliminieren. Deshalb wurden die Tiere zwei Tage nach der ersten Berenilgabe noch einmal mit 35mg/kg behandelt, einer Dosis, die nach Jennings et al. (1979) den stärksten Trypanozideffekt besitzt, ohne eine negative Auswirkung auf den Wirt zu haben. Einen Tag nach dieser zweiten Berenilgabe waren keine Trypanosomen mehr nachweisbar. Dies bedeutete jedoch nicht, daß damit die Trypanosomen auf Dauer eliminiert waren. Zwar hielt dieser scheinbare "Trypanosomen-freie" Zustand noch längere Zeit an, aber ca.30 Tage nach der Berenil-Behandlung waren 50% der Mäuse wieder Trypanosomen-positiv. Berenil konnte offensichtlich nur die in der Zirkulation befindlichen Parasiten eliminieren. Ein Rest hält sich offenbar in Berenil unzugänglichen Nischen auf, von wo aus eine Reinfektion des Blutes erfolgen kann. Dieser Zusammenhang wurde zum ersten Mal von Jennings et al. (1977) beschrieben, die zeigten, daß dauerhafte Eliminierung durch Berenil nur erfolgt, wenn das Chemotherapeutikum innerhalb der ersten Woche nach dem Infektionsbeginn verabreicht wird. Diese Befunde konnten von mir bestätigt werden. Mäuse, die 5 Tage nach dem Infektionsbeginn mit Berenil behandelt wurden, enthielten selbst nach 5 Monaten keine Parasiten mehr. Nicht bestätigen ließ sich allerdings der weitere Befund von Jennings (1979), nämlich daß die Trypanosomen, die für die rezidivierende Infektion verantwortlich sind, aus Gehirnregionen entstammen. Nach Reinjektion von Gehirnhomogenat Berenil behandelter infizierter Mäuse in Trypanosoma-freie Tiere konnte keine Parasitämie induziert werden (Nicht im Detail beschrieben). Diese Unterschiede in den Ergebnissen könnten zwei Ursachen haben. Die Art Trypanosoma brucei, die von Jennings et al. verwendet wurden, ist

den menschlichen Schlafkrankheitserregern sehr ähnlich und kann wahrscheinlich im Gegensatz zu T.congolense tatsächlich die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Anderseits ist es aber außerordentlich schwierig, Gehirn-Homogenat völlig ohne Bluteinschlüsse herzustellen. Da das Blut cerebraler Kapillaren viele Trypanosomen enthält (Mills et al., 1980), könnte eine artifizielle Beimengung vom Blut die Ursache für das scheinbare Vorhandensein von Trypanosomen in Gehirn-Homogenat aus Jennings-Versuchen sein.

Im Gegensatz zu Berenil, das die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann, wird Melarsoprol (Specia, Paris) als Therapeutikum der menschlichen Schlafkrankheit eingesetzt. Versuche, Melarsoprol auch zur Chemotherpie T.congolense infizierter Mäuse einzusetzen, scheiterten daran, daß seine toxische Wirkung zu hoch war, selbst nach Reduktion der von Clarkson et ál. (1983) angegebenen Dosis von 1.5mg/kg.

Bei T.congolense-Infektionen scheint das Gehirn als Quelle der rezidivierenden Infektionen keine Rolle zu spielen. Es ist allerdings unklar, aus welcher Gewebsregion heraus eine Wiederbesiedlung des Blutes durch Parasiten erfolgt. Auch wenn man üblicherweise T.congolense zu den ausschließlichen Blutparasiten rechnet, so scheint doch klar, daß sich auch diese Trypanosomen-Spezies in bestimmten Gewebsregionen aufhalten kann, z.B. in Lymphknoten (Luckins et al., 1978,1979). Möglicherweise sind auch solche Bereiche nicht für Berenil zugänglich.

Ganz generell normalisierten sich unmittelbar nach Berenilgabe alle gemessenen Parameter, angefangen von hämatologischen Werten über die Plasmaproteine und Enzymaktivitäten bis zu den Gewebsveränderungen.

Wie Holmes und Jennings (1976) sowie Mackenzie et al. (1978) einen positiven Einfluß von Berenil auf die durch T.congolense-Infektion geänderten hämatologischen Parameter feststellten, wurde die Normalisierung der hämatologischen Werte der infizierten Mäuse bereits am 3.Tag nach der 2. Berenilgabe beobachtet. Auffallend war, daß sich, ähnlich wie bei der Parasitämie beobachtet, einige Zeit nach der Berenil-Behandlung alle Meßwerte wieder veränderten, besonders in den Fällen wo Trypanosomen erneut im Blut auftraten. Die völlig positive Wirkung von Berenil (Holmes und Jennings, 1976; Mackenzie et al., 1978) ist sehr wahrscheinlich auf den zu kurzen Untersuchungszeitraum zurückzuführen.

Die Milz- und Leber-Vergrößerungen ließen sich nach der zweiten Berenilgabe sehr stark rückgängig machen (Abb.23), mit dem Wiedererscheinen der Trypanosomen pendelten sie sich wieder auf die Werte der unbehandelten infizierten Mäuse ein. Diese Tendenz war bei den Gewebsveränderungen am deutlichsten zu erkennen.

Der Zusammenhang zum Wiederauftreten von Trypanosomen war bei der Harnstoffkonzentration und dem Proteingahalt nicht deutlich zu bestätigen. Wie die nicht sofort nach der Infektion auftretende Veränderung von Harnstoff, kann auch die Erhöhung der Harnstoffkonzentration nach Aufhören der Berenil-Wirkung sich länger verzögern.

Aus der Plasmaelektrophorese ergab sich, daß die durch Berenilgabe auftretende Abnahme des Gesamtproteins meistens auf dem Abfall von Fraktionen 8 und 9 beruht. Die durch Infektion stark zunehmende Fr. 12 nahm kurz nach der Behandlung mäßig ab, aber blieb danach wieder auf dem erhöhten Wert. Mit dem Wiederauftreten der Trypanosomen stieg Fr. 9 relativ schnell auf den Wert der unbehandelten infizierten Mäuse an.

Ob der Abfall von IgM nach der ersten Berenilgabe durch Berenil direkt verursacht wurde, ist die Frage, weil auch die infizierten Mäuse ohne Behandlung am gleichen Tag ähnlich relative Werte zeigten. Danach stieg der IgM-Spiegel mit der Zeit, obwohl keine Trypanosomen im Blut nachweisbar waren. Nach Clarkson (1976) sowie Luckins (1975) fiel das erhöhte IgM nach der Behandlung ab. Clarkson. stellte erhöhte IgM nur nach dem Wiedererscheinen der Trypanosomen fest. Bei unseren Untersuchungen war keine Korrelation zwischen der Eliminierung der Trypanosomen durch Berenilgabe und dem Abfall von IgM festzustellen.

Allerdings zeigte sich bei der Untersuchung der Plasmaenzyme, daß Berenil allein bereits eine starke Erhöhung der Aktivitäten der untersuchten Enzyme verursachte (s. Abb.22, Tab.7), obwohl die während der Infektionsverlaufszeit erhöhten Aktivitäten von LDH, GOT und GPT unmittelbar nach der Berenil-Behandlung abnahmen. Deshalb sanken die Enzymaktivitäten der mit Berenil behandelten infizierten Mäuse nicht auf die Werte der unbehandelten sondern nur geringfügig auf die der mit Berenil behandelten Kontrolltiere. Bei den Gesamt-Enzymaktivitäten konnte keine deutliche Korrelation zwischen dem Wiederauftreten der Trypanosomen und ihrem Anstieg, vor allem bei GOT und GPT, beobachtet werden.

Die Veränderungen der LDH-Isoenzyme ergaben, daß die Aktivitäten von LDH_1, LDH_4 und LDH_5 der behandelten Kontroll-Mäuse genau so stark anstiegen wie die der infizierten sowie der behandelten infizierten Mäuse. Die anderen Isoenzyme (LDH_2 und LDH_3) waren bei den behandelten Kontrollen und den behandelten infizierten Mäusen nicht so hoch wie bei den infizierten Mäusen.
Daraus ergab sich, daß Berenil die Aktivitäten von LDH_1, LDH_4 und LDH_5 selbst bei Kontrolltieren erhöhte, aber die im Infektionsverlauf erhöhten Aktivitäten von LDH_2 sowie LDH_3 nur zum Teil beheben konnte. Die Zunahme von LDH_4 und LDH_5 durch Berenil könnte auf die Leberschädigung zurückgeführt wurden, die als Nebenwirkung der Diamidine von Brand et al. (1982) beschrieben wurden. Außerdem ist anzunehmen, daß die durch Behandlung auftretende Abnahme der LDH_3 mit der Normalisierung der Milzgröße bzw. der Monozyten-, Thrombozytenanzahl zusammenhängt, weil LDH_3 aus Milz, Lymphozyten stammt und durch infektiöse Mononucleosis oder die Störung der Thrombozyten sowie Milznekrosis gesteigert wird (Moss, 1982).

Daraus ergibt sich für die praktische Chemotherapie das Problem, daß eine einmalige Berenil-Behandlung nur dann einen Therapieerfolg zeigt, wenn sie kurz nach der Infektion erfolgt. In jedem anderen Fall verspricht nur eine Dauer-Behandlung Erfolg. Da damit aber unweigerlich auch der Wirtsorganismus beeintächtigt wird, stellt dies zweifellos noch keine Ideal-Therapie dar, selbst wenn in der Praxis keine Alternative besteht.

4.2. Akute Infektion

Derselbe Mäusestamm, der gegenüber den T.congolense (T.C. 4905) einen chronischen Infektionsverlauf zeigte, reagierte gegenüber dem T.congolense-Stamm (T.C.423) mit einer akuten Infektion, die durch eine rasch steigende Parasitämie kennzeichnet war, und mit dem Tod der Tiere nach 3 bis 4 Tagen endete. Der höchste Wert der Parasitämie lag dabei mit $3x10^8$ Tryp./ml Blut ca.10 mal höher als der der chronischen Infektion. Dies liegt entweder an der höheren Virulenz des Stammes (T.C.423) oder an einer unterschiedlich starken Abwehrreaktion des Wirtsorganismus auf die beiden Stämme.

Im Gegensatz zu den komplexen Veränderungen im Verlauf der chronischen Infektion ergab sich bei der akuten Infektion nur ein

auffallender Befund. 24 bis 48 Stunden p.i., dem Zeitpunkt, an dem Trypanosomen deutlich im peripheren Blut nachweisbar waren, stiegen die Enzymaktivitäten von LDH und GOT deutlich an und erreichten nach 96 Stunden den 2-3 fachen Wert gegenüber den Kontrollen. Die Serum-Aktivitäten von alkalischer Phosphatase oder saurer Phosphatase blieben im Rahmen der Meßgenauigkeit unverändert. Die absoluten Werte der Enzymaktivitäten, auch die der Kontroll-Tiere, lagen erheblich höher als bei den entsprechenden Untersuchungen während der chronischen Infektion (Vergleich Abb.27 und Abb.10-13). Dies liegt sicherlich daran, daß die Blutgewinnung bei der akuten Infektion durch Dekapitation erfolgte. Durch die Gewebsverletzungen treten intrazelluläre Enzyme aus, und erhöhen dadurch beträchtlich die Enzymnormalwerte im Serum. Insofern waren die ermittelten absoluten Werte nicht repräsentativ, dennoch war ein deutlicher Unterschied zwischen infizierten und Kontroll-Tieren zu sehen.

Um den Einfluß der unterschiedlichen Blutabnahme-Technik abschätzen zu können, wurden die Enzymaktivitäten am 3.Tag p.i.aus Plasma bestimmt, das nicht durch Dekapitation sondern wie bei den Versuchen im Rahmen der chronischen Infektion nach Nembutal-Betäubung und Eröffnung aus der Vene Cava Posterior gewonnen wurde. Hierbei sind nur die Enzymaktivitätswerte der Kontrollen deutlich niedriger, dagegen die Relativ-Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierten Tieren groß. So wurde durch Trypanosoma-Infektion die LDH-Aktivität auf das ca.9-fache, die GOT-Aktivität auf das 4-fache gesteigert. Außerdem war eine Verdoppelung der alkalischen Phosphatase festzustellen. Dieser Effekt wurde maskiert durch die nach Dekapitation erfolgende starke Erhöhung der Normalwerte, die schon bei den Kontroll-Tieren höher waren als bei den infizierten Tieren, deren Blut nicht durch Dekapitation gewonnen wurde (Vergleich Abb.27, Tab.8).

Außer den drastischen Erhöhungen der Enzymaktivitäten war noch eine leichte Anämie festzustellen, sichtbar durch einen etwa 17%-igen Abfall des Hämatokritwerts. Der Hämoglobinwert fiel allerdings nur um ca. 5%. Alle anderen Parameter, die sich in der chronischen Infektion deutlich veränderten, waren annähernd identisch mit den Kontrollwerten. Bestenfalls läßt sich eine gewisse Milzvergrößerung diagnostizieren, die aber wesentlich schwächer ist als die am 3.Tag der chronischen Infektion.

Der Anstieg von LDH, GOT und GPT stimmte mit den Ergebnissen bei mit T.congolense akut infizierten Mäusen von Whitelaw et al. (198 (1980) überein, lediglich waren bei unseren Versuchen der Anstieg des Harnstoffs und der Abfall der Glukose nicht zu bestätigen. Dies scheint auf der Infektionsdauer zu beruhen (unsere Bestimmungen wurden am 3.Tag p.i.; ihre Bestimmungen am 8. bzw. 10.Tag p.i. durchgeführt).

So massiv die Enzymaktivitäten im Plasma der akuten infizierten Mäuse auch sind, so läßt sich daraus sicherlich nicht eine Folgerung für die Todesursache der Tiere ableiten. Äußerlich geht dem Exitus ein Zustand völliger Apathie und Erschöpfung voraus. Diese Symptomatik läßt sich aus den gemessenen Parametern heraus nicht begründen. Nach wie vor bleibt unklar, woran bei einer akuten T. congolense-Infektion die Tiere wirklich sterben.

5. Zusammenfassung

Im Verlauf von chronischen und akuten Infektionen mit Trypanosoma congolense wurden die Veränderungen verschiedener Blutparameter untersucht.

Während der chronischen Infektion stiegen die Enzymaktivitäten von Lactatdehydrogenase, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase bereits am 3.Tag nach der Infektion an, ebenso änderten sich hämatologische Parameter, und das Milzgewicht nahm deutlich zu. Nach dem 10.Tag p.i. konnten auch Veränderungen des Lebergewichts, des Gesamt-Proteingehalts im Serum und der Harnstoffkonzentration nachgewiesen werden.

Detailliertere Analysen zeigten, daß bei der LDH im wesentlichen das Isoenzym 5 betroffen war, bei den Plasmaproteinfraktionen einzelne Fraktionen der alpha- und beta-Globuline, sowie insgesamt die gamma-Globuline. An Leber- und Milz-Schnitten konnte histochemisch die Zunahme lysosomaler Aktivitäten festgestellt werden.

Bei den hämatologischen Veränderungen standen Abnahme der Erythrozyten und Thrombozyten -und damit verlängerte Gerinnungszeiten- und eine Zunahme von Lymphozyten und monozytären Zellen im Vordergrund.

Behandlung mit dem Trypanozid Berenil normalisierte nach kurzer Zeit die veränderten Parameter. Allerdings war der Erfolg nicht von Dauer. Mit dem Wiedererscheinen der Parasiten im Blut traten an mehreren Parametern dieselben Veränderungen wie zuvor erneut auf.

Bei akuten Infektionen waren entsprechende Veränderungen zu beobachten -allerdings erst kurz vor dem Exitus- besonders ausgeprägt waren dabei die Enzymveränderungen bei LDH und GOT.

Die Experimente zeigten: 1. Pathologische Veränderungen bei T.congolense Infektionen lassen sich auf mehreren Ebenen nachweisen. 2. Keine der Veränderungen kann sicher verantwortlich gemacht werden für die Schwere der Erkrankung -vor allem nicht für den Tod der Tiere bei der akuten Infektion. 3. Es lassen sich keine prinzipiellen Unterschiede zwischen akuten und chronischen Infektionen aufzeigen. 4. Berenilbehandlung führt ledglich zu einer vorübergehenden Besserung -auch der veränderten Blutparameter- es sei denn, das Medikament wird unmittelbar nach der Infektion verabreicht.

6. Literaturverzeichnis

Anosa, V.O., J.J. Kaneko (1984)
Vet. pathol. 21, 229-237

Banks, K.L. (1978)
J. Protozool. 25, 241-245

Banks, K.L. (1979)
J. Protozool. 26, 103-108

Banks, K.L. (1980)
J. Parasitol. 66, 34-37

Barka, T., P.J. Anderson (1963)
In: Histochemistry, theory, practice and bibliography, Harper and Row, Inc. New York, Evanston, London

Bauer, F. (1955)
Zschr. f. Tropenmed. Parasitol. 6, 129-140

Bauer, F. (1956)
Arzneim. Forsch. 6, 674-677

Bauer, F. (1958)
Zentr. Bakteriol. Parasitenk., Abt.I, Orig. 172, 605-620

Bergmeyer, H.U. (1974)
In: Methoden der enzymatischen Analyse, 3.Auflage, Verlag Chemie, Weinheim

Bock, J,. R. Supperer (1983)
In: Veterinärmedizinische Parasitologie, 55-61, Paul Pary, Berlin und Hamburg

Bradfield, J.W.B., M. Wells (1978)
Lacent II, 836

von Brand, T. (1979)
In: Biochemistry and Physiology of Endoparasites, 391-417, Elsevier North Holland, Amsterdam

Brander, G.C., D.M. Pugh, R.J. Bywater (1982)
In: Vetrinary applied pharmacology & therapuetics, 525-527, Balliere Tindall, London

Bratton, A.C., E.K. Marshall (1939)
J. Biol. Chem. 128, 537-541

Browning, C.H., K.M. Calver (1943)
J. Pathol. Bacteriol. 55, 393-394

Büngener, W., G. Müller (1976)
Tropenmed. Parasitol. 27, 270-271

Büngener, W. (1983)
Tropenmed. Parasitol. 34, 213-219

Clarkson, A.B.Jr., C.J. Bacchi, G.H. Mellow, H.C. Nathan, P.P. Mccann, A. Sjoerdsma (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 5729-5733

Clarkson, M.J. (1975)
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 69, 272-279

Clarkson, M.J. (1976)
In: Pathophysiology of Parasitic Infection, (Soulsby, E.J.L. eds.), 171-182, Academic Press, New York

Dame, D.A. (1970)
In: The African Trypanosomiases, (Mulligan, H.W., Potts, W.H. eds.), 533-542, Allen & Unwin, London

Dargie, J.D., P.K. Murray, N. Murray, W.R.T. Grimshaw, W.I.M. Mcintyre (1979a)
Parasitol. 78, 271-286

Dargie, J.D., P.K. Murray, M. Murray, W.I.M. Mcintyre (1979b)
Res. Vet. Sci. 26, 245-247

Diehl, E.J., E.L. Risby (1974)
Am. J. Trop. Med. Hyg. 23, 1019-1022

Diffley, P., B.M. Honigberg, F.A. Mohn (1976)
J. Parasitol. 62, 136-137

Fairclough, R. (1963)
Vet. Rec. 75, 1107-1112

Fiennes, R.N.T.W. (1970)
In: The African Trypanosomiases, (Mulligan, H.W., Potts, W.H. eds), 729-750, Allen & Unwin, London

Forsberg, C.M., V.E.O. Valli, P.W. Gentry, R.M. Donworth (1979)
Vet. Pathol. 16, 229-242

Frimmer, M., G. Lämmler (1977)
In: Pharmakologie und Toxikologie, 94-98, K.Schattauer Verlag, Stuttgart

Fußgänger, R., F. Bauer (1958)
Medizin und Chemie 6, 504-531

Gebhardt, R., D. Mecke (1983)
The EMBO J. 4, 567-570

Gebhardt, R., D. Mecke (1984)
In: Glutamine Metabolism in Mammalian Tissues, (Häussinger,D., H. Sies eds.), Springer-Verlag,Berlin, Heidelberg

Gilbert, R.J., B.A. Newton (1982)
Vet. Rec. 111, 397

Gilbert, R.J. (1983)
Br. J. Pharmac. 80, 133-139

Goodman, D.W.S. (1958)
J. Amer. Chem. Soc. 80, 3892-3898

Goodwin, L.G., M.W. Guy (1973)
Parasitol. 66, 499-513

Goodwin, L.G., E.G. Tierney (1977)
Parasitol. 74, 33-45

Graubaum, H.J. von (1977)
Deutsch. Gesundh. Wesen 32, 1087-1119

Gray, A.R., C.J. Roberts (1971)
Parasitol. 63, 67-89

Griffin, L., E.W. Allonby (1979)
Vet. Parasitol. 5, 97-105

Hayashi, M., Y. Nakajima, W.H. Fischman (1964)
J. Histochem. Cytochem. 12, 293-297

Holmes, P.H., C. Mammo, A. Thomson, P.A. Knight, R. Lucken, P.K. Murray, M. Murray, F.W. Jennings, G.M. Urquhart (1974)
Vet. Rec. 95, 86-87

Holmes, P.H., F.W. Jennings (1976)
In: Pathophysiology of Parasitic Infection (Soulsby, E.J.L. eds.), 199-210, Academic Press, New York

Ikede, B.O., M. Lule, R.J. Terry (1977)
Acta Tropica 34, 53-60

Jarofke, R., M. Siegert, L. Ballowitz (1981)
Res. Exp. Med. (Berl) 178, 117-130

Jendrassik, L., P. Gróf (1938)
Biochem. Z. 297, 81

Jennings, F.W., D.O. Whitelaw, G.M. Urquhart (1977)
Parasitol. 75, 143-153

Jennings, F.W., D.O. Whitelaw (1979)
Int. J. Parasitol. 9, 381-484

Jensch, H. (1955)
Arzneim. Forsch. 5, 634-635

Jensch, H. (1958)
Medizin und Chemie 6, 138-169

Joyner, L.P. (1980)
J. Paotozool. 27, Suppl. 31. A No.76

Kaaya, G.P., V.E.O. Valli, M.G. Maxie, G.J. Losos (1979)
Tropenmed. Parasitol. 30, 230-235

von Kampen, E.J., W.G. Zlylstra (1961)
Clin. Chem. Acta 6, 538

Kilgour, R.V., D.G. Godfrey, B.K. Naisa (1975)
Ann. Trop. Med. Parasitol. 69, 329-335

Klatt, P.D., P.D. Hajdu (1976)
Vet. Rec. 99, 372-374

Kobayashi, A., I.R. Tizard (1976a)
Tropenmed. Parasit. 27, 411-417

Kobayashi, A., I.R. Tizard, P.T.K. Woo (1976b)
Am. J. Trop. Med. Hyg. 25, 401-406

Krampitz, H.E. (1970)
Tropenmed. Parasit. 21, 1-20

Lauell, C.B. (1966)
Anylyt. Biochem. 15, 45-52

Losos, G.J., B.O. Ikede (1972)
Vet. Pathol. 9, (Suppl.) 1-71

Losos, G.J., J. Paris, W.J. Wilson, E.K. Dar (1973)
Bull. Epizool. Dis. Afr. 21. 239-248

Losos, G.J., P.M. Mwambu (1979)
In: Pathogenicity of Trypanosomen (Losos, G.J., Chouinard, A. eds.) 178-183, IDRRC, Ottawa-Canada

Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall (1951)
J. Biol. Chem. 193, 265-275

Luckins, A.G. (1972)
Br. Vet. J. 128, 523-528

Luckins, A.G. (1975)
Ann. Trop. Med. Parasit. 69, 337-344

Luckins, A.G., D. Mehlitz (1976)
Ann. Trop. Med. Parasit. 70, 479-480

Luckins, A.G., D. Mehlitz (1978)
Trop. Animal Health Prod. 10, 149-159

Luckins, A.G., A.R. Gray (1979)
Res. Vet. Sci. 27, 129

Mackenzie, P.K.I., J.G. Cruickshank (1973)
Ves. Vet. Sci. 15, 256-262

Mackenzie, P.K.I., W.P. Boyt, V.W. Nesham, E. Pirie (1978)
Res. Vet. Sci. 24, 4-7

Mackenzie, P.K.I., W.P. Boyt, V.W. Nesham (1979)
Br. Vet. J. 35, 178-184

Mamo, E., P.H. Holmes (1975)
Res. Vet. Sci. 15, 256-262
Mansfield, J.M., S.A. Craig, G.T. Stelzer (1976)
Infct. Immun. 14, 976-981
Mansfield, J.M. (1978)
Cell. Immunol. 39, 204-212
Mansfield, J.M., O. Bagasra (1978)
J. Immunol. 120, 759-765
Maxie, M.G., G.J. Losos, H. Tabel (1979)
Tropenmed. Parasit. 30, 247-282
Mills, J.N., V.E.O. Valli, K.S. Boo, C.M. Forsberg (1980)
Tropenmed. Parasit. 31, 299-312
Morrison, W.I., M. Murray (1979)
In: Pathogenecity of Trypanosomes, (Losos, G.J., A. Chouinar eds,), 154-160, IDRRC, Ottawa-Canada
Morrison, W.I., M. Murray, C.A. Hinson (1982)
J. Pathol. 138, 273-288
Moss, D.W. (1982)
In: Isoenzymes, 1-204, Chapman and Hall, London
Murray, M., G.M. Urquhart (1977)
In: Advances in Experimental Medicine and Biology (Miller, L.H., J.J. Mckelvey, Jr., eds.), 93, 209-241, Plenum Press
Naylor, D.D. (1971)
Trop. Animal Health Prod. 3, 95-100, 159-168, 203-207
Newton, B.A., R.W.F. Le Page (1967)
Biochem. J. 105, 50p
Newton, B.A. (1970)
Adv. Pharmacol. Chemotherp. 8, 149-184
Newton, B.A. (1972)
In: Comparative biochemistry of parasites (Van den Bossche, H. eds.), 127-138, Academic Press, London
Nielsen, K.J., J. Sheppard, W. Holmes, J.R. Tizard (1978)
Immunology 35, 817-826
Ojak, L. (1983)
Vet. med. Diss., Gießen
Ojala, K., A. Konthinen (1977)
In: Enzymes in Health and Disease, 118-122, Inaug Science, Meet. Int. Soc. Cli. Enzymol., Karger, Basel

Ormerod, W.E. (1979)
Pharmac. Ther. 6, 1-44

Raether, W., P. Hajdu, H. Seidenath, D. Damm (1972)
Z. Tropenmed. Parasit. 23, 418-427

Rick, W. (1977)
In: Klinische Chemie und Mikroskopie, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

Sadun, E.H., A.J. Johnson, R.B. Nagle, R.E. Duxbury (1973)
Amer. J. Trop. Hyg. 22, 323-330

Schmidl, M., T. Mix (1981)
In: Laboruntersuchungen für die Diagnose und Verlaufskontrolle in der Verterinärmedizin, 60-61, Boehringer-Manmheim

Shnitzer, D.J., F. Hawking (1963)
In: Experimental chemotherapy, I, 176-177, Academic Press, London

Shek, P.N., S.A. Howe (1982)
J. Immunological Methode 53, 255-260

Siegert, M., H. Siemes (1977)
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 635-644

Siegert, M. (1978)
In: Proceedings of the 25th. colloquim, Pergamon Press, Oxford-New York

Simaren, J.O., F.M. Bammeke (1970)
Ann. Parasitol. 45, 305-313

Simaren, J.O., J.I. Awopetu (1973)
Ann. Parasitol. 48, 433-446

Soltys, M.A., P.T.K. Woo (1977)
In: Parasitic protozoa I, (Kreier, J.P. eds.), 239-268, Academic Press, London

Stephen, L.E. (1966)
Ann. Trop. Med. Parasit. 60, 230-246

Tabel, H., G.J. Losos, M.G. Maxie (1980)
Tropenmed. Parasit. 31, 99-104

Tabel,H., M.G. Maxie, G.J. Losos, Ch.E. Minder (1981)
Tropenmed. Parasit. 32, 149-153

Tartour, G., O.F. Idris (1973)
Res. Vet. Sci. 15, 24-32

Terry, R.J., K.M. Hudson, M.F. Shirazi (1979)
Int. Atomic Energy Agency Symposium, 7-11. Mai 1979, Wien

Tizard, I.R., W.L. Holmes (1976)
Experienta 32, 1533-1534
Tizard, I.R., W.L. Holmes, D.A. York, A. Mollors (1977)
Experienta 33, 101
Tizard, I.R., J. Hay, B.N. Wilikie (1978a)
Res. Vet. Sci. 25, 131-132
Tizard, I.R., W.L. Holmes, K. Nielsen (1978b)
Tropenmed. Parasit. 29, 108-114
Tizard, I.R., W.L. Holmes, K. Nielsen (1978c)
Tropenmed. Parasit. 29, 127-133
Tizard, I.R., K.H. Nielsen, J.R. Seed, J.E. Hall (1978d)
Microbiol. Rev. 42, 661-681
Treadwell, P.E. (1969)
J. reticuloendothel. Soc. 6, 354
Urquhart, G.M. (1980)
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 74, 726-729
Valli, V.E.O., C.M. Forsberg, G.A. Robinson (1978a)
Vet. Pathol. 15, 608-820
Valli, V.E.O., C.M. Forsberg, B.J. Mcscherry (1978b)
Vet. Pathol. 15, 723-745
Valli, V.E.O., C.M. Forsberg, J.H. Lumsden (1979)
Vet. Pathol. 16, 96-107
Valle, V.E.O:, C.M. Forsberg (1979)
Vet. Pathol. 16. 334-368
Valli, V.E.O., J.M. Mills, J.H. Lumsden, J.B. Rattray, C.M.
Forsberg (1980)
Tropenmed. Parasitol. 31, 288-298
Van der Helm, H.J. (1961)
Lacent II, 108
Van der Laarse, A., N.J. Dykshoorn, L. Hollaar, Th. Caspers (1980)
Clin. Chem. Acta 104, 381-391
Weber, E. (1980)
In: Grundriß der biologischen Statistik, 172-175, Gustav
Fischer Verlag, Stuttgart, New York
Wellde, B., R. Lötzsch, G. Deindl, E. Sadun, J. William, G. Warui
(1974)
Exp. Parasitol. 36, 6-19

Wellde, B., R.M. Kovatch, D.A. Chumo, D.E. Wykoff (1978)
Exp. Parasitol. 45, 26-33

Wellde, B., D.A. Chumo, M. Adoyo, R.M. Kovatch, G.N. Mwongela, E.A. Opiyo (1983)
Trop. Anim. Health Prod. 15, 95-102

Whitelaw, D.O., J.A. Macaskill, P.H. Holmes, F.W. Jennings, G.M. Urquhart (1980)
Infection und Immunity 27, 707-713

Wieme, R.J. (1970)
In: Methodé der enzymatischen Analyse, Vol.I, 702-708
Verlag Chemie, Weinheim

William, J.R. (1970)
In: Medicinal Chemistry, (Burger, A. eds.), 562-569, Wiley-interscience, New York, London, Sydoney, Toronto

Herrn Prof. Dr. H.-J. Risse danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die freundschaftliche / Anregung bei der Durchführung der Arbeit.

Mein bester Dank gilt Herrn Dr. E. Reinwald für seine Beratung in der Durchführung und der Anfertigung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Siegert möchte ich für seine Unterstützung bei der Durchführung der Elektrophoresen danken.

Für die Durchführung der histologischen Untersuchungen und die Hilfe bei der photographischen Arbeit und bei der Auswertung der Ergebnisse danke ich Herrn Prof. Dr. J. Schlüns.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für ihre fachliche und menschliche Unterstützung bei der Arbeit.

Lebenslauf

24.5.1948	Geboren in Tokio/Japan Vater: Mikio Ikawa, Diplomkaufmann Mutter: Sakuko Ikawa, geb. Gyobu
1955-1961	Besuch der städtischen Grundschule in Tokio
1961-1964	Besuch der städtischen Mittelschule in Tokio
1964-1967	Besuch der staatlichen an die Tokio Universität für Kunst und Wissenschaft angegliederten Oberschule
1967-1971	Besuch der pharmazeutischen Hochschule Tokio
1971	Pharmazeutisches Staatsexamen
1971-1972	Beruftätigkeit als Assistentin im Bereich Hygiene an der pharmazeutischen Hochschule Tokio
1972	Staatliche Zulassung als technische Assistentin für klinische Hygiene
1972-1980	Beruftätigkeit an der toxikologisch-biochemischen Abteilung im Forschungsinstitut des Gesundheitsamts in Tokio
24.5.1979	Heirat mit Munehisa Takeya, Magister der Philosophie
1980	Besuch und Abschluß des Deutschkurses der Grundstufe 2 im Goethe Institut Berlin
1980-1981	Besuch des Deutschkurses zur Immatrikulation an der Freien Universität Berlin
Feb. 1982	Beginn der Promotion im Institut für Veterinär-Biochemie der FU Berlin unter Anleitung von Prof. H.-J. Risse

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen